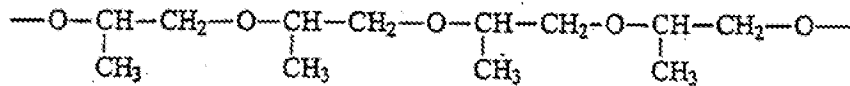


少なくとも5又は6個のポリアルキレングリコールサブユニットを有する。最適にはオリゴマーのポリアルキレングリコール成分は少なくとも7個のポリアルキレングリコールサブユニットを有する。オリゴマーのポリアルキレングリコール成分は好ましくはポリエチレングリコール成分、ポリプロピレングリコール成分、又はポリブチレングリコール成分のような低級アルキルポリアルキル\*



この均一ポリプロピレングリコール構造は、ポリプロピレングリコール鎖中の各酸素原子に隣接し、ただ1個のメチル置換型炭素原子を有する様に記載されている。このような均一ポリプロピレングリコール成分は親油及び親水特性の両方を示すことから、親油性ポリマー成分を使用せずに両性成長ホルモン(amphiphilic)薬物-オリゴマー結合体を提供するのに有益である。更に、ポリプロピレングリコール成分の第2アルコール成分と薬物との結合により、例えば胃の中に見いだされるトリプシン及びキモトリプシンのような酵素による分解に対する抵抗性が向上した薬物(例えばポリペプチド)が提供される。

【0206】本発明の実施形態による均一ポリプロピレングリコールは図11から13に例示され、以下記載されるように好ましく合成される。図11に例示の如く、1, 2-エポキシジオール53は第1アルコールブロッキング試薬と反応し、第2アルコール延長モノマー54を提供する。第1アルコールブロッキング試薬は当業者に理解されるような各種第1アルコールブロッキング試薬であり、 $\epsilon$ -ブチルジフェニル塩化シリル及び $\epsilon$ -ブチルジメチル塩化シリルのような塩化シリル化合物、及びAc:Oのようなエステル化試薬を含むが、これらに限定されない。好ましくは、第1アルコールブロッキング試薬は実質的に $\epsilon$ -ブチルジフェニル塩化シリル又は $\epsilon$ -ブチルジメチル塩化シリルのような第2アルコールブロッキング試薬と反応しない第1アルコールブロッキング試薬である。第2アルコール延長モノマー(54)はメタンスルホンクロリド(MeSO<sub>3</sub>Cl)と反応し、第1延長アルコールモノマーメシレート55を提供する。

【0207】あるいは、第2アルコール延長モノマー54は第2アルコールブロッキング試薬と反応し化合物56を提供する。第2アルコールブロッキング試薬は塩化ベンジルを含むがこれに限定されない、当業者に理解されるような各種第2アルコールブロッキング試薬である。化合物56はB<sub>1</sub>脱ブロッキング試薬と反応せしめられ、ブロッキング試薬B<sub>1</sub>が除かれ、第1アルコール延長モノマー57を与える。B<sub>1</sub>脱ブロッキング試薬は当業者に理解されているような各種脱ブロッキング剤か

\*レングリコール成分である。ポリアルキレン成分がポリプロピレングリコール成分である場合には、ポリプロピレングリコール成分は好ましくは均一構造を有する。典型的な均一構造を有するポリプロピレングリコール成分は次の通りである：

【化12】

ら選択される。第1アルコールがエステルを形成することによりブロックされた場合には、B<sub>1</sub>脱ブロッキング試薬は塩基(例えば炭酸カリウム)のような脱エステル化試薬である。第1アルコールが塩化シリルを用いブロックされている場合には、B<sub>1</sub>脱ブロッキング試薬は好ましくはテトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)である。第1アルコール延長モノマー57はメタンスルホンクロリドと反応し第2アルコール延長モノマーメシレート58を与える。

【0208】第1アルコール延長モノマー54及び第2アルコール延長モノマー57は次の様にキャップされる。第2アルコール延長モノマー57はキャッピング試薬と反応し化合物59を与える。キャッピング試薬は塩化メチルのようなハロゲン化アルキルを含むが、これに限定されない当業者により理解されるような各種キャッピング試薬である。化合物59は上記のB<sub>1</sub>脱ブロッキング試薬と反応し、第1アルコールキャッピングモノマー60を与える。第1アルコールキャッピングモノマー60はメタンスルホンクロリドと反応し、第2アルコールキャッピングモノマーメシレート61を与える。第1アルコール延長モノマー57はキャッピング試薬と反応し化合物62を与える。キャッピング試薬は上記の各種キャッピング試薬であろう。化合物62はB<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬と反応せしめられブロッキング成分B<sub>2</sub>が除かれ、第2アルコールキャッピングモノマー63を与える。B<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬は当業者により理解されるような各種脱ブロッキング剤であり、パラジウム/活性炭触媒存在下のH<sub>2</sub>を含むが、これに限定されない。第2アルコールキャッピングモノマーはメタンスルホンクロリドと反応し第1アルコールキャッピングモノマーメシレート64を与える。図11に例示の実施形態はキャッピングモノマーの合成を示すが、同様の反応が実施されキャッピングポリマーが与えられことが理解される。

【0209】一般に、鎖延長は第1アルコールモノマー57のような第1アルコール延長モノマー又はポリマーと、第1アルコール延長モノマーメシレート55のような第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートとを反応させ各種均一ポリプロピレン鎖を与えるか、又

は第2アルコール延長モノマー54のような第2アルコール延長モノマー又はポリマーと、第2アルコール延長モノマーメシレート58のような第2アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートとを反応させることで実行される。

【0210】例えば図13では、第1アルコール延長モノマーメシレート55は第1アルコール延長モノマーメシレート57と反応し、ダイマー化合物65を与える。あるいは、第2アルコール延長モノマーメシレート58は第2アルコール延長モノマー54と反応し、ダイマー化合物65を与える。ダイマー化合物65上の上記B：ブロッキング成分を上記B：脱ブロッキング試薬を使用して取り除き、第1アルコール延長ダイマー66を与える。第1アルコール延長ダイマー66はエタンスルホニルクロリドと反応し第2アルコール延長ダイマーメシレート67を与える。あるいはダイマー化合物65上の上記B：ブロッキング成分を上記B：脱ブロッキング試薬を使用し取り除き、第2アルコール延長ダイマー69を与える。第2アルコール延長ダイマー69はメタンスルホニルクロリドと反応させられ、第1アルコール延長ダイマーメシレート70を与える。

【0211】当業者により理解される如く、その他各種鎖長を得るために鎖延長プロセスを繰り返すことができる。例えば図13に例示される如く、第1アルコール延長ダイマー66は第1アルコール延長ダイマーメシレート70と反応し、テトラマー化合物72を与える。図13に更に例示されるように、一般的鎖延長反応機構は第1アルコール延長モノマー又はポリマー73を第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレート74と反応させ、均一ポリプロピレンポリマー75を与える。m及びnの値はそれぞれ0から1000またはそれ以上の範囲である。好ましくは、m及びnはそれぞれ0から50である。図13に例示の実施形態は第1アルコール延長モノマー及び/又はポリマーメシレートと反応する第1アルコール延長モノマー及びポリマーを示すが、同様の反応は第2アルコール延長モノマー及び/又はポリマーと第2アルコール延長モノマー及び/ポリマーメシレートを用いても実施することができる。

【0212】第1アルコール延長モノマー又はポリマーの末端又は第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートの末端はそれぞれ、第1アルコールキャッピングモノマー又はポリマーメシレート、あるいは第1アルコールキャッピングモノマー又はポリマーと反応し、キャップされた均一ポリプロピレン鎖を与えることができる。例えば図12に例示される如く、第1アルコール延長ダイマーメシレート70は第1アルコールキャッピングモノマー60と反応し、キャップされ/ブロックされた第1アルコール延長トリマー71を与える。当業者により理解される如く、B：ブロッキング成分は取り除か

れ、得られたキャップ型第1アルコール延長トリマーは第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートと反応し、キャップ型トリマー71を延長する。

【0213】第2アルコール延長モノマー又はポリマーの末端、又は第2アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートの末端はそれぞれ、第2アルコールキャッピングモノマー又はポリマーメシレート、あるいは第2アルコールキャッピングモノマー又はポリマーと反応し、キャップされた均一ポリプロピレン鎖を与えることができる。例えば図12に例示される如く、第2アルコール延長ダイマーメシレート67は第2アルコールキャッピングモノマー63と反応し、キャップされ/ブロックされた第1アルコール延長トリマー68を与える。B：ブロッキング成分は上述のように取り除かれ、得られたキャップ型第2アルコール延長トリマーは第2アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートと反応し、キャップ型トリマー68を延長する。図12に例示の合成はトリマーを与えるダイマーとキャッピングモノマーとの反応を示すが、キャッピングプロセスは均一ポリプロピレングリコール成分の合成時のいかなる時点でも実施できるか、又はそれに代わり均一ポリプロピレングリコール成分はキャップされないまま与えられてもよいと理解すべきである。図12に例示の実施形態はキャッピングモノマーを用いた合成によるポリブチレンオリゴマーのキャッピングを示しているが、本発明のポリブチレンオリゴマーは上記図11内に記載のキャッピング試薬を使用し直接キャップ（即ちキャッピングモノマーの付加なしに）してもよいと理解される。

【0214】本発明の実施形態による均一ポリプロピレングリコール成分は、ポリエチレングリコール成分に関しここに記載されている方法を含むがこれに限定されない当業者に理解される各種方法により、薬物、カルボン酸のような親油性成分、及び/又は各種その他の成分に結合させることができる。

【0215】オリゴマーは親水性成分、親油性成分、スパーサー成分、リンカー成分及び末端成分を含むが、これに限定されない当業者により理解されるようにその他の成分を1又はそれ以上含んでよい。オリゴマー内の各種成分は加水分解性又は非加水分解性の結合により相互に共有結合させることができる。

【0216】オリゴマーは更に糖、ポリアルキレングリコール、及びポリアミン/PEGコポリマーを含むが、これらに限定されない親水性成分を1又はそれ以上含んでよい。隣接するポリアルキレングリコール成分は、それらがエーテル結合により結合されている場合には同一成分であり、同一アルキル構造を有すると考えられる。例えば成分

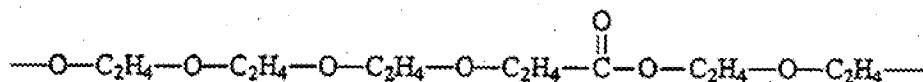
【化13】



は6個のポリエチレングリコールサブユニットを有する単一ポリエチレングリコール成分である。隣接するポリアルキレングリコール成分は、それらがエーテル結合以外の結合により結合されている場合、又はそれらが別の\*

\*アルキル構造を有する場合には、異なる成分と考えられる。例えば成分

【化14】



は4個のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコール成分と2個のポリエチレングリコール成分を有する親水性成分である。好ましくは本発明の実施形態によるオリゴマーはポリアルキレングリコール成分を含むが、親水性成分はそれ以上含まない。

【0217】オリゴマーは、当業者により理解されるように、1又はそれ以上の親油性成分を更に含んでよい。親油性成分は好ましくは飽和型又は不飽和型、直鎖型又は分岐型のアルキル成分、又は飽和型あるいは不飽和型、直鎖型又は分岐型脂肪酸成分である。親油性成分がアルキル成分の場合、1ないし28個の炭素原子を有する直鎖型の飽和型又は不飽和型アルキル成分が好ましい。より好ましくは、アルキル成分は2ないし12個の炭素原子を有する。親油性成分が脂肪酸成分の場合には、2ないし18個の炭素原子を有する直鎖型の飽和型又は不飽和型である天然脂肪酸が好ましい。より好ましくは、脂肪酸成分は3ないし14個の炭素原子を有する。最も好ましくは、脂肪酸成分は少なくとも4、5又は6個の炭素原子を有する。

【0218】オリゴマーは、当業者により理解されるように、更に1又はそれ以上のスペーサー成分を更に含んでよい。スペーサー成分は、例えば親水性成分を親油性成分から分離するのに、親油性成分又は親水性成分を薬物から分離するのに、第1親水性又は親油性成分を第2親水性又は親油性成分から分離するのに、又は親水性成分又は親油性成分をリンカー成分から分離するのに使用される。スペーサー成分は好ましくは糖、コレステロール及びグリセリン成分から成る群より選択される。

【0219】オリゴマーは、当業者により理解されるように、オリゴマーを薬物と結合させるのに使用されるリンカー成分を更に1又はそれ以上含んでよい。リンカー成分は好ましくはアルキル及び脂肪酸成分から成る群から選択される。

【0220】オリゴマーは、薬物と結合しない1又はそれ以上の末端成分を1又はそれ以上のオリゴマー末端に含んでよい。末端成分は好ましくはアルキル又はアルコキシ成分であり、より好ましくは低級アルキル又は低級アルコキシ成分である。最適には、末端成分はメチル又はメトキシである。末端成分は好ましくはアルキル又は

アルコキシ成分であり、末端成分は当業者により理解されるような各種成分でよく、糖、コレステロール、アルコール及び脂肪酸を含むが、それに限定されない。

【0221】オリゴマーは好ましくは薬物に共有結合される。幾つかの実施形態では、薬物は加水分解性結合（例えばエステル又はカーボネート結合）を利用し、オリゴマーに結合される。加水分解性結合は、プロドラッグとして働く薬物-オリゴマー結合体を提供する。ある例では、例えば薬物-オリゴマー結合体が不活性である場合（即ち結合体が薬物の主要作用機構を通じた影響を及ぼす能力を欠いている）、時間放出又は制御型放出効果を目的として加水分解性結合が与えられ、1又はそれ以上のオリゴマーがそれぞれに対応する薬物-オリゴマー結合体から切り出され、活性薬物を提供するにつれて、薬物は、所定時間にわたり投与される。別の実施形態では、薬物は非加水分解性結合を利用しオリゴマーに結合される（例えば、カルバメート、アミド又はその他結合）。非加水分解性結合は、薬物-オリゴマー結合体を長時間、好ましくは少なくとも2時間血流中に循環させることが望まれる場合に好ましい。

【0222】オリゴマーは好ましくは薬物と共有結合されるが、もちろんオリゴマーは薬物と非共有結合し非共有結合結合型薬物-オリゴマー複合体を形成してもよい。当業者により理解される如く、非共有結合には水素結合、イオン結合、バンデルワールス結合、ミセル又はリポソームカプセル化が含まれるが、これらに限定されない。本発明の実施形態によれば、当業者に理解される如く選択された手法で、オリゴマーは好適に構築され、変性され、そして/又は適当に官能化され、非共有結合結合に関する能力が付与される（例えば水素結合能の付与）。本発明の他の実施形態によれば、オリゴマーはアミノ酸、オリゴペプチド、ペプチド、胆汁酸、胆汁誘導体、脂肪酸、脂肪酸誘導体、サリチル酸、サリチル酸誘導体、アミノサリチル酸及びアミノサリチル酸誘導体を含むが、これに限定されない各種化合物により誘導化される。得られたオリゴマーは薬物分子、医薬製品及び/又は医薬賦形剤と非共有結合的に結合（複合体化）できる。得られた複合体は平衡化された親油及び親水特性を有することが好ましい。本発明の更に別の実施形態によ

れば、オリゴマーはアミン、及び／又はアルキルアミンにより誘導化される。好適酸性条件下では、得られたオリゴマーは薬物分子、医薬製品、及び／又は医薬賦形剤と非供給結合型結合複合体を形成できる。このような複合体化により得られた産物は好ましくは平衡化された親油及び親水特性を有する。

【0223】1より多いオリゴマー（即ち複数のオリゴマー）が薬物に結合されてよい。複数のオリゴマーは同一であることが好ましい。しかし、複数のオリゴマーが相互に異なるか、あるいは複数のオリゴマーの幾つかが同一であり、幾つかは異なっているてもよい。オリゴマーの複数のオリゴマーが薬物に結合する場合、1又はそれ以上のオリゴマーが薬物と加水分解性結合で結合され、そして1又はそれ以上のオリゴマーが非加水分解性結合により薬物と結合することが好ましい。あるいは、複数のオリゴマーと薬物を結合する結合の全てが加水分解性ではあるが様々な強さの加水分解性を有しており、例えばオリゴマーの1またはそれ以上は体内における加水分解により薬物から速やかに外されるが、オリゴマーの1又はそれ以上は体内に於ける加水分解により薬物からゆっくり外される。

【0224】オリゴマーは、求核性ヒドロキシル官能基及び／又はアミノ官能基を含むがこれらに限定されない薬物の各種求核性残基にて、薬物と結合する。薬物がポリペプチドの場合、求核性ヒドロキシル官能基は、例えばセリン及び／又はチロシン残基、及び求核性アミノ官能基の場合には例えばヒスチジン及び／又はリジン残基、及び／又はポリペプチドの1又はそれ以上のN-末端に見いだされる。オリゴマーがポリペプチドの1又はそれ以上のN-末端に結合する場合、結合は好ましくは第2アミンを形成する。例えば、薬物がヒトインスリンと結合する場合、オリゴマーはGly<sup>A1</sup>のアミノ官能性、Phe<sup>B1</sup>のアミノ官能性、及びLys<sup>B29</sup>のアミノ官能性を含むインスリンのアミノ官能性に結合する。1個のオリゴマーがヒトインスリンと結合する場合、オリゴマーは好ましくは、Lys<sup>B29</sup>のアミノ官能性に結合する。2個のオリゴマーがヒトインスリンと結合する場合、オリゴマーは好ましくはPhe<sup>B1</sup>のアミノ官能性、及びLys<sup>B29</sup>のアミノ官能性に結合する。1より多いオリゴマーがヒトインスリンと結合することもあるが、モノ結合体ヒトインスリンでより高い活性（改善されたグルコース低下能力）が観察される。別の例として、薬物はサケカルシトニンである場合、オリゴマーはN-末端のLys<sup>11</sup>、Lys<sup>18</sup>及びN-末端のアミノ官能性を含むサケカルシトニンのアミノ官能性と結合させることができる。1又はそれ以上のオリゴマーがサケカルシトニンに結合されるが、1つのオリゴマーがLys<sup>11</sup>の官能性に結合し、そして1つのオリゴマーがLys<sup>18</sup>のアミノ官能性に結合するジ結合体サケカルシトニンについてより高い活性はオリゴマー

（改善されたグルコース低下能力）が観察された。更に別の例として、薬物がヒト成長ホルモンの場合、オリゴマーはPhe<sup>1</sup>、Lys<sup>38</sup>、Lys<sup>41</sup>、Lys<sup>70</sup>、Lys<sup>115</sup>、Lys<sup>146</sup>、Lys<sup>148</sup>、Lys<sup>159</sup>、Lys<sup>168</sup>、及び／又はLys<sup>173</sup>のアミノ官能性に結合する。

【0225】混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、各種方法により合成することができる。例えば、混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、カルボン酸及びポリエチレングリコールを含むオリゴマーの混合物は、混合物中の各ポリエチレングリコール成分が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有するオリゴマーの混合物を提供するのに十分な条件の下に、カルボン酸混合物と、混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコールの混合物とを接触することで合成される。次に混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する混合物のオリゴマーは、それらが薬物と反応し薬物-オリゴマー結合体を与える様に活性化される。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の実施形態の一つが図3に例示されており、以下の実施例11～18に記載されている。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の別の実施形態は図4に例示され、以下の実施例19～24に記載されている。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の更に別の実施形態は図5に例示されており、そして以下の実施例25～29に記載されている。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路のより更に別の実施形態が図6に例示されており、以下の実施例30～31に記載されている。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の別の実施形態が図7に例示されており、以下の実施例32～37に記載されている。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の更に別の実施形態が図8に例示されており、以下の実施例38に記載されている。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路のより更に別の実施形態が図9に例示されており、以下の実施例39に記載されている。混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する

る活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の別の実施形態が図10に例示されており、以下の実施例40に記載されている。

【0226】混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物は、例えば以下の実施例41～120に記載の様に薬物-オリゴマー結合体の混合物を与えるのに十分な条件の下に、薬物の実質的単分散混合物と反応させられるだろう。当業者に理解されている様に、混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物と薬物の混合物との反応より生じる薬物-オリゴマー結合体の混合物が、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する結合体の混合物になる様に反応条件（例えば選択モル比、溶媒混合物及び／又はpH）を制御することができる。例えばリジンのアミノ官能性に於ける結合は、反応溶液のpHをリジンのpK<sub>a</sub>より低く維持することで抑制される。あるいは、薬物-オリゴマー結合体の混合物は、例えばHPLCを使用することで分離、単離されて薬物オリゴマー結合体、例えば混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する単一、二又は三結合体の実質的単分散混合物を提供する。具体的な単離型結合体の結合度（例えば単離分子が単一、二又は三結合体であるかどうか）は、質量分光法を含むがこれに限定されない当業者により理解される各種技術を使用することで決定され、及び／又は証明される。具体的な結合体の構造（例えばオリゴマーがヒトインスリンモノ結合体のGly<sup>31</sup>、Phe<sup>31</sup>又はLys<sup>32,33</sup>に存在するか否か）は、配列分析、ペプチドマッピング、選択的酵素切断及び／又はエンドペプチダーゼ切断を含むがこれに限定されない当業者により理解される各種技術を使用することで決定され、及び／又は証明される。

【0227】当業者により理解されるように、薬物上にある1又はそれ以上の反応部位は、例えば薬物をN-tert-ブトキシカルボニル（t-BOC）又はN-（9-フルオレニルメトキシカルボニル）（N-FMOC）のような好適ブロッキング試薬と反応することでブロックされる。このプロセスは、例えば薬物がポリペプチドであり、ポリペプチドの1又はそれ以上のN末端にオリゴマーを有する不飽和結合体（即ち、全ての求核性残基が結合されていないもの）を形成するのが好ましい場合に、有利である。このようなブロッキングに続きブロック型薬物混合物は、混合物中の各オリゴマーが同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化オリゴマーの混合物と反応せしめられ、オリゴマーを1又はそれ以上の求核性残基に結合し、その他核性残基にブロッキング成分が結合した薬物-オリゴマー結合体の混合物を与える。結合反応後、薬物-オリゴマー結合体は当業者が理解する様にして脱ブロックされる。必要

に応じ、薬物-オリゴマー結合体は次に上記の様に分離され、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物が提供される。あるいは、薬物-オリゴマー結合体の混合物は脱ブロッキング前に分離される。

【0228】本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、通常の混合物と比べ改善された特性を好ましく有する。例えば混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物のインビトロ活性に比べより高いインビトロ活性を好ましく有する。当業者により理解されるように、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、例えばH. R. AllcockとF. W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394～402（第2版、1991）に記載の如くゲルパーミエーションクロマトグラフィのようなサイズ排除クロマトグラフィを含むが、これに限定されない各種方法により測定される。

【0229】別の例としては、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物のインビトロ活性に比べより高いインビトロ活性を好ましく有する。当業者により理解されるように、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィを含むが、これに限定されない各種方法により測定される。

【0230】特定混合物のインビトロ活性は、当業者に知られる各種方法にて測定できる。好ましくは、インビトロ活性はカリフォルニア州、サンニャール（Sunnyvale）にあるモレキュラーデバイス社（Molecular Devices Corporation）より販売されているサイトセンサー（Cytosensor）（登録商標）マイクロフィジオメーター（Microphysiometer）を使用し測定される。マイクロフィジオメーターはトランスウエル中の培養細胞に加えられた薬物に対する反応中の細胞外酸性化速度の微小変化をモニターする。この反応は試験対象分子の活性に比例する。

【0231】さらに別の例としては、混合物中の各結合

体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物のキモトリプシンによる分解に対する抵抗性に比べて高い、キモトリプシンによる分解に対する抵抗性を好ましく有する。当業者により理解されるように、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィを含むがこれに限定されない各種方法により測定される。

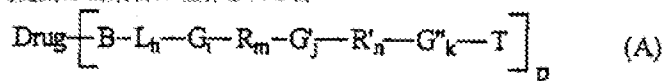
【0232】更に別の例としては、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物の被験者間変動に比べて小さい被験者間変動を好ましく有する。当業者により理解されるように、混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィを含むが、これに限定されない各種方法により測定される。被験者間変動は当業者に理解される各\*

\*種方法により測定することができる。被験者間変動は好ましくは次の様にして計算される。用量反応曲線(AUC)下面積(即ち、用量反応曲線とベースライン値との間の面積)を各検体について決定する。全ての被験者に関する平均AUCは、各被験者のAUCを合計し、そして合計値を被験者数で除し決定される。次に各被験者について、被験者のAUCと平均AUC間の差の絶対値を決定する。得られた差の絶対値を次に合計して被験者変動を示す値を得る。低い数値ほど被験者間の変動が低いことを表し、高い値ほど被験者間変動が高いことを表す。

【0233】本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、上記改善特性の2又はそれ以上を有することが好ましい。より好ましくは、本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は上記改善特性の3又はそれ以上を有する。最適には、本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同一数のポリエチレングリコールサブユニットを有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は上記改善特性の4つ全てを有する。

【0234】本発明の更に別の実施形態では、各結合体が同一分子量を有し且つ次式：

【数5】

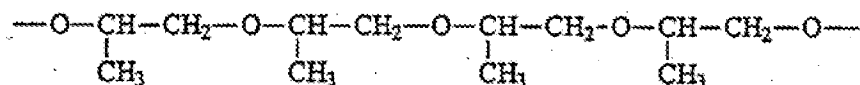


(式中、Bが結合成分であり；Lがリンカー成分であり；G、G'及びG''は独立に選択されたスペーサー成分であり；Rは親油性成分であり且つR'がポリアルキレングリコール成分であるか、又はR'は親油性成分であり且つRがポリアルキレングリコール成分であり；Tが端末成分であり；Rがポリアルキレングリコール成分である場合には、b、i、j、k、m及びnが個別に0又は1であり、mが1であり、R'がポリアルキレングリコール成分である場合には、nは1であり；pは1から薬物上の求核性残基の数までの整数である)を有する混合物が提供される。

【0235】本発明のこれらの実施形態によれば、R又はR'はポリアルキレン成分である。オリゴマーは当業者に理解されているようなポリアルキレングリコール成分を含む。好ましくは、ポリアルキレングリコール成分\*

30※は少なくとも2、3又は4個のポリアルキレングリコールサブユニットを有する。より好ましくは、ポリアルキレングリコール成分は少なくとも5又は6個のポリアルキレングリコールサブユニットを有する。最適にはオリゴマーのポリアルキレングリコール成分は少なくとも7個のポリアルキレングリコールサブユニットを有する。オリゴマーのポリアルキレングリコール成分は好ましくはポリエチレングリコール成分、ポリプロピレングリコール成分、又はポリブチレングリコール成分のような低級アルキルポリアルキレングリコール成分である。ポリアルキレン成分がポリプロピレングリコール成分である場合には、ポリプロピレングリコール成分は好ましくは均一構造を有する。典型的な均一構造を有するポリプロピレングリコール成分は次の通りである：

【化15】



この均一ポリプロピレングリコール構造は、ポリプロピレングリコール鎖中の各酸素原子に隣接した1個のメ

チル置換型炭素分子を有する様に記載されている。このような均一ポリプロピレングリコール成分は親油及び親

水特性の両方を示すことから、親油性ポリマー成分を使用せずに両性成長ホルモン薬物-オリゴマー結合体を提供するのには有益である（すなわち、 $m+n$ の合計は1である）。更に、ポリプロピレングリコール成分の第2アルコール成分と薬物との結合により、例えば胃の中に見いだされるトリプシン及びキモトリプシンのような酵素による分解に対する抵抗性が向上した薬物（例えばポリペプチド）が提供される。

【0236】本発明の実施形態による均一ポリプロピレングリコールは図11から13に例示され、以下記載されるように好ましく合成される。図11に例示の如く、1、2-エポキシプロパンジオール53は第1アルコールブロッキング試薬と反応し、第2アルコール延長モノマー54を提供する。第1アルコールブロッキング試薬は当業者に理解されるような各種第1アルコールブロッキング試薬であり、 $\alpha$ -ブチルジフェニル塩化シリル及び $\alpha$ -ブチルジメチル塩化シリルのような塩化シリル化合物、及びAc、Oのようなエステル化試薬を含むが、これらに限定されない。好ましくは、第1アルコールブロッキング試薬は実質的に $\alpha$ -ブチルジフェニル塩化シリル又は $\alpha$ -ブチルジメチル塩化シリルのような第2アルコールブロッキング試薬と反応しない第1アルコールブロッキング試薬である。第2アルコール延長モノマー（54）はメタンスルホンクロリド（ $\text{MeSO}_3\text{Cl}$ ）と反応し、第1延長アルコールモノマーメシレート55を提供する。

【0237】あるいは、第2アルコール延長モノマー54は第2アルコールブロッキング試薬と反応し化合物56を提供する。第2アルコールブロッキング試薬は塩化ベンジルを含むがこれに限定されない、当業者に理解されるような各種第2アルコールブロッキング試薬である。化合物56はB<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬と反応せしめられ、ブロッキング試薬B<sub>2</sub>が除かれ、第1アルコール延長モノマー57を与える。B<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬は当業者に理解されているような各種脱ブロッキング剤から選択される。第1アルコールがエステルを形成することによりブロックされた場合には、B<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬は塩基（例えば炭酸カリウム）のような脱エステル化試薬である。第1アルコールが塩化シリルを用いブロックされている場合には、B<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬は好ましくはテトラブチルアンモニウムフルオリド（TBAF）である。第1アルコール延長モノマー57はメタンスルホンクロリドと反応し第2アルコール延長モノマーメシレート58を与える。

【0238】第1アルコール延長モノマー54及び第2アルコール延長モノマー57は次の様にキャップされる。第2アルコール延長モノマー54はキャッピング試薬と反応し化合物59を与える。キャッピング試薬は塩化メチルのようなハロゲン化アルキルを含むが、これに限定されない当業者により理解されるような各種キャッ

ピング試薬である。化合物59は上記のB<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬と反応し、第1アルコールキャッピングモノマー60を与える。第1アルコールキャッピングモノマー60はメタンスルホンクロリドと反応し、第2アルコールキャッピングモノマーメシレート61を与える。第1アルコール延長モノマー57はキャッピング試薬と反応し化合物62を与える。キャッピング試薬は上記の各種キャッピング試薬であってよい。化合物62はB<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬と反応せしめられブロッキング成分B<sub>2</sub>が除かれ、第2アルコールキャッピングモノマー63を与える。B<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬は当業者により理解されるような各種脱ブロッキング剤であり、パラジウム/活性炭触媒存在下のH<sub>2</sub>を含むが、これに限定されない。第2アルコールキャッピングモノマーはメタンスルホンクロリドと反応し第1アルコールキャッピングモノマーメシレート64を与える。図11に例示の実施形態はキャッピングモノマーの合成を示すが、同様の反応が実施されキャッピングポリマーが与えられることが理解される。

【0239】一般に、鎖延長は第1アルコールモノマー57のような第1アルコール延長モノマー又はポリマーと第1アルコール延長モノマーメシレート55のような第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートとを反応させ各種均一ポリプロピレン鎖を与えるか、又は第2アルコール延長モノマー54のような第2アルコール延長モノマー又はポリマーと、第2アルコール延長モノマーメシレート58のような第2アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートとを反応させることで実行される。

【0240】例えば図13では、第1アルコール延長モノマーメシレート55は第1アルコール延長モノマーメシレート57と反応し、ダイマー化合物65を与える。あるいは、第2アルコール延長モノマーメシレート58は第2アルコール延長モノマー54と反応し、ダイマー化合物65を与える。ダイマー化合物65上の上記B<sub>2</sub>ブロッキング成分を上記B<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬を使用して取り除き、第1アルコール延長ダイマー66を与える。第1アルコール延長ダイマー66はエタンスルホンクロリドと反応し第2アルコール延長ダイマーメシレート67を与える。あるいはダイマー化合物65上の上記B<sub>2</sub>ブロッキング成分を上記B<sub>2</sub>脱ブロッキング試薬を使用し取り除き、第2アルコール延長ダイマー69を与える。第2アルコール延長ダイマー69はメタンスルホンクロリドと反応させられ、第1アルコール延長ダイマーメシレート70を与える。

【0241】当業者により理解される如く、その他各種鎖長を得るために鎖延長プロセスを繰り返すことができる。例えば図13に例示される如く、第1アルコール延長ダイマー66は第1アルコール延長ダイマーメシレート70と反応し、テトラマー化合物72を与える。図1



3に更に例示されるように、一般的鎖延長反応機構では、第1アルコール延長モノマー又はポリマー73を第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレート74と反応させ、均一ポリプロピレンポリマー75を与え、m及びnの値はそれぞれ0から1000またはそれ以上の範囲である。好ましくは、m及びnはそれぞれ0から50である。図13に例示の実施形態は第1アルコール延長モノマー及び/又はポリマーメシレートと反応する第1アルコール延長モノマー及びポリマーを示すが、同様の反応は第2アルコール延長モノマー及び/又はポリマーと第2アルコール延長モノマー及び/ポリマーメシレートを用いても実施できることが理解される。

【0242】第1アルコール延長モノマー又はポリマーの末端又は第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートの末端はそれぞれ、第1アルコールキャッピングモノマー又はポリマーメシレート、あるいは第1アルコールキャッピングモノマー又はポリマーと反応し、キャップされた均一ポリプロピレン鎖を与え得る。例えば図12に例示される如く、第1アルコール延長ダイマーメシレート70は第1アルコールキャッピングモノマー60と反応し、キャップされ/ブロックされた第1アルコール延長トリマー71を与える。当業者により理解される如く、B、ブロック成分は取り除かれ、得られたキャップ型第1アルコール延長トリマーは第1アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートと反応し、キャップ型トリマー71を延長する。

【0243】第2アルコール延長モノマー又はポリマーの末端、又は第2アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートの末端はそれぞれ、第2アルコールキャッピングモノマー又はポリマーメシレート、あるいは第2アルコールキャッピングモノマー又はポリマーと反応し、キャップされた均一ポリプロピレン鎖を与えることができる。例えば図12に例示される如く、第2アルコール延長ダイマーメシレート67は第2アルコールキャッピングモノマー63と反応し、キャップされ/ブロックされた第2アルコール延長トリマー68を与える。当業者により理解される如く、B、ブロック成分は取り除かれ、得られたキャップ型第2アルコール延長トリマーは第2アルコール延長モノマー又はポリマーメシレートと反応し、キャップ型トリマー68を延長する。図12に例示の合成はトリマーを与えるダイマーとキャッピングモノマーとの反応を示すが、キャッピングプロセスは均一ポリプロピレングリコール成分の合成時のいかなる時点でも実施でき、又はそれに代わり均一ポリプロピレングリコール成分はキャップされないまま与えられてもよいと理解される。図12に例示の実施形態はキャッピングモノマーを用いた合成によるポリブチレンオリゴマーのキャッピングを示しているが、本発明のポリブチレンオリゴマーは上記図11内に記載のキャッピング試薬を使用し直接キャップ（即ちキャッピングモノマーの付

加なしに）してもよいと理解される。

【0244】本発明の実施形態による均一ポリプロピレングリコール成分は、ポリエチレングリコール成分に関しここに記載されている方法を含むがこれに限定されない当業者に知られる各種方法により、薬物、カルボン酸のような親油性成分、及び/又は各種その他の成分に結合させることができる。

【0245】本発明のこれらの実施形態によると、当業者により理解されるように、R又はR'は親油性成分を含んでよい。親油性成分は好ましくは飽和型又は不飽和型、直鎖型又は枝分かれ型のアルキル成分、又は飽和型あるいは不飽和型、直鎖型又は枝分かれ型脂肪酸成分である。親油性成分がアルキル成分の場合、1ないし28個の炭素原子を有する直鎖型の飽和型又は不飽和型アルキル成分が好ましい。より好ましくは、アルキル成分は2ないし12個の炭素原子を有する。親油性成分が脂肪酸成分の場合には、2ないし18個の炭素原子を有する直鎖型の飽和型又は不飽和型である天然脂肪酸が好ましい。より好ましくは、脂肪酸成分は3ないし14個の炭素原子を有する。より好ましくは、脂肪酸成分は少なくとも4、5又は6個の炭素原子を有する。

【0246】本発明のこれらの実施形態によると、スパーサー成分G、G'、G''、当業者には理解されるであろうスパーサー成分である。スパーサー成分は好適には、糖、コレステロール、グリセリン成分から成る群から選択される。好適には、これらの実施形態のオリゴマーには、スパーサー成分は含まない（すなわち、i、j、およびkは好適には0である）。

【0247】本発明のこれらの実施形態によると、リンカー成分、Lは、当業者には理解されるであろう薬物とオリゴマーを結合させるのに使用されることが可能である。リンカー成分は好適には、アルキルおよび脂肪酸成分から成る群から選択される。

【0248】本発明のこれらの実施形態によると、末端成分は好適にはアルキルあるいはアルコキシ成分であり、より好ましくは低級アルキル又は低級アルコキシ成分である。最適には、末端成分はメチル又はメトキシである。末端成分は当業者により理解されるような各種成分でよく、糖、コレステロール、アルコール及び脂肪酸を含むが、それに限定されない。

【0249】本発明のこれらの実施形態によると、式Aの構造の括弧で囲われている成分で表わされているオリゴマーは、薬物に共有結合される。幾つかの実施形態では、薬物は加水分解性結合（例えばエステル又はカーボネート結合）を利用し、オリゴマーに結合される。加水分解性結合は、プロドラッグとして働く薬物-オリゴマー結合体を提供するにつれて、薬物が所定時間にわたり投与される。ある例では、例えば薬物-オリゴマー結合体が不活性である場合（即ち結合体が薬物の主要作用機構を通じて体に影響を及ぼす能力を欠いている）、時間放



出又は制御型放出効果を目的として加水分解性結合が与えられ、1又はそれ以上のオリゴマーがそれぞれに対応する薬物-オリゴマー結合体から切り出され、活性薬物を提供するにつれて、薬物が所定時間にわたり投与される。別の実施形態では、薬物は非加水分解性結合を利用しオリゴマーに結合される(例えば、カルバメート、アミド又はその他結合)。非加水分解性結合は、薬物-オリゴマー結合体を長時間、好ましくは少なくとも2時間血流中に循環させることが望まれる場合に好ましい。結合成分Bは当業者に理解されるであろう薬物とオリゴマーを共有結合に利用する様々な結合成分でありうる。結合成分は好適には、共有結合、エステル成分、カルボネート成分、カルバミート成分、アミド成分、第2アミン成分から成る群から選択される。

【0250】変数pは1から薬物上にある求核残基の数までの整数である。pが1よりも大きい場合、1つより多いオリゴマー(すなわち、複数のオリゴマー)がその薬物に結合される。本発明のそれらの実施形態によると、複数のオリゴマーは同じものである。

【0251】オリゴマーは、求核性ヒドロキシル官能基及び/又はアミノ官能基を含むがこれらに限定されない薬物の各種求核性残基にて、薬物と結合する。薬物がポリペプチドの場合、求核性ヒドロキシル官能基は、例えばセリン及び/又はチロシン残基、及び求核性アミノ官能基の場合には例えばヒスチジン及び/又はリジン残基、及び/又はポリペプチドの1又はそれ以上のN-末端に見いだされる。オリゴマーがポリペプチドの1又はそれ以上のN-末端に結合する場合、結合は好ましくは第2アミンを形成する。例えば、薬物がヒトインスリンと結合する場合、オリゴマーはGly<sup>31</sup>のアミノ官能性、Phe<sup>81</sup>のアミノ官能性、及びLys<sup>329</sup>のアミノ官能性を含むインスリンのアミノ官能性に結合する。1個のオリゴマーがヒトインスリンと結合する場合、オリゴマーは好ましくはLys<sup>62-9</sup>のアミノ官能性に結合する。2個のオリゴマーがヒトインスリンと結合する場合、オリゴマーは好ましくはPhe<sup>81</sup>のアミノ官能性、及びLys<sup>829</sup>のアミノ官能性に結合する。1より多いオリゴマーがヒトインスリンと結合することもあるが、モノ結合体ヒトインスリンでより高い活性(改善されたグルコース低下能力)が観察される。別の例として、薬物がサケカルシトニンである場合、オリゴマーはN-末端のLys<sup>11</sup>、Lys<sup>18</sup>及びN-末端のアミノ官能性を含むサケカルシトニンのアミノ官能性と結合され得る。1又はそれ以上のオリゴマーがサケカルシトニンに結合されるが、1つのオリゴマーがLys<sup>11</sup>の官能性に結合し、そして1つのオリゴマーがLys<sup>18</sup>のアミノ官能性に結合する2結合サケカルシトニンについてより高い活性(改善されたグルコース低下能力)が観察された。更に別の例として、薬物がヒト成長ホルモンの場合、オリゴマーはPhe<sup>1</sup>、Lys

s<sup>38</sup>、Lys<sup>41</sup>、Lys<sup>70</sup>、Lys<sup>115</sup>、Lys<sup>140</sup>、Lys<sup>145</sup>、Lys<sup>158</sup>、Lys<sup>168</sup>、及び/又はLys<sup>172</sup>のアミノ官能性に結合する。

【0252】混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、各種方法により合成できる。例えば、カルボン酸とポリエチレングリコールより成るオリゴマー混合物は、オリゴマー混合物を与えるのに十分な条件の下にカルボン酸の混合物とポリエチレングリコールの混合物とを接触せしめることで合成される。次に混合物のオリゴマーは、それらが薬物と反応し薬物-オリゴマー結合体を与える様に活性化される。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の実施形態の一つが図3に例示されており、以下の実施例11~18に記載されている。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の別の実施形態は図4に例示され、以下の実施例19~24に記載されている。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の更に別の実施形態は図5に例示されており、そして以下の実施例25~29に記載されている。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路のより更に別の実施形態が図6に例示されており、以下の実施例30~31に記載されている。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の別の実施形態が図7に例示されており、以下の実施例32~37に記載されている。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の更に別の実施形態が図8に例示されており、以下の実施例38に記載されている。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路のより更に別の実施形態が図9に例示されており、以下の実施例39に記載されている。各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を与える合成経路の別の実施形態が図10に例示されており、以下の実施例40に記載されている。

【0253】各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物は、例えば以下の実施例41~120に記載のように、薬物-オリゴマー結合体の混合物を与えるのに十分な条件の下に、混合物中の各薬物が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物の混合物と反応させることができる。当業者に知られる様に、反応条件(例えば選択モル比、溶媒混合物及び/又はpH)は、各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物と薬物の混合物との反応より生じる薬物-オリゴマー結合体の混合物が、各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する結合体の混

合物になる様に制御することができる。例えばリジンのアミノ官能性に於ける結合は、反応溶液のpHをリジンのpKより低く維持することで抑制される。あるいは、薬物-オリゴマー結合体の混合物は、例えばHPLCを使用することで分離、単離され、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物オリゴマー結合体、例えば単一、二又は三結合体の混合物を提供することができる。具体的な単離型結合体の結合度（例えば単離分子が単一、二又は三結合体であるかどうか）は、質量分光法を含むがこれに限定されない当業者により理解される各種技術を使用することで決定され、及び/又は証明される。具体的な結合体の構造（例えばオリゴマーがヒトインスリンモノ結合体のGly<sup>31</sup>、Phe<sup>31</sup>又はLys<sup>328</sup>に存在するか否か）は、配列分析、ペプチドマッピング、選択的酵素切断及び/又はエンドペプチダーゼ切断を含むがこれに限定されない当業者により理解される各種技術を使用することで決定され、及び/又は証明される。

【0254】当業者により理解されるように、薬物上にある1又はそれ以上の反応部位は、例えば薬物をN-tert-ブトキシカルボニル（t-BOC）又はN-（9-フルオレニルメトキシカルボニル）（N-FMOC）のような好適ブロッキング試薬と反応させることでブロックされる。この工程は、例えば薬物がポリペプチドであり、ポリペプチドの1又はそれ以上のN末端にオリゴマーを有する不飽和結合体（即ち、全ての求核性残基が結合されていないもの）を形成するのが好ましい場合に有利である。このようなブロッキングに続きブロック型薬物混合物は、混合物中の各オリゴマーが同一分子量及び式Aの構造を有する活性化オリゴマーの混合物と反応せしめられ、1又はそれ以上の求核性残基に結合したオリゴマーを有し且つその他の求核性残基と結合したブロッキング成分を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物を与える。結合反応後、薬物-オリゴマー結合体は当業者が理解する様に脱ブロックされる。必要に応じ、薬物-オリゴマー結合体は次に上記の如く分離され、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物が提供される。あるいは、薬物-オリゴマー結合体の混合物は脱ブロッキング前に分離される。

【0255】本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、通常の混合物と比べ改善された特性を好ましく有する。例えば混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物のインビボ活性に比べより高いインビボ活性を好ましく有する。当業者により知られる様に、混合物中

の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、例えばH. R. AllcockとF. W. Lampe、CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402（第2版、1991）に記載の如くゲルパーミエーションクロマトグラフィのようなサイズ排除クロマトグラフィを含むが、これに限定されない各種方法により測定される。

【0256】別の例としては、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物のインビトロ活性に比べより高いインビトロ活性を好ましく有する。当業者により理解されるように、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィを含むが、これに限定されない各種方法により測定される。

【0257】特定混合物のインビトロ活性は、当業者に知られる各種方法にて測定できる。好ましくは、インビトロ活性はカリフォルニア州、サニーバール（Sunnyvale）にあるモレキュラーデバイス社（Molecular Devices Corporation）より販売されているサイトセンサー（Cytosensor）（登録商標）マイクロフィジオメーター（Microphysiometer）を使用し測定される。マイクロフィジオメーターはトランスウエル中の培養細胞に加えられた薬物に対する反応中の細胞外酸性化速度の微小変化をモニターする。この反応は試験対象分子の活性に比例する。

【0258】さらに別の例としては、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物のキモトリプシンによる分解に対する抵抗性に比べて、高いキモトリプシンによる分解に対する抵抗性を好ましく有する。当業者に知られる様に、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィを含むがこれに限定されない各種方法により測定される。

【0259】更に別の例としては、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物と同一の数平均分子量を有する薬物-オリゴマー結合体の多分散混合物の被験者間変動に比べて小さい被験者間

変動を好ましく有する。当業者に知られる様に、混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量及び多分散混合物の数平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィーを含むが、これに限定されない各種方法により測定される。被験者間変動は当業者により知られる各種方法により測定することができる。被験者間変動は好ましくは次の様にして計算される。用量反応曲線(AUC)下面積(即ち、用量反応曲線とベースライン値との間の面積)を各被験者について決定する。全ての被験者に関する平均AUCは、各被験者のAUCを合計し、そして合計値を被験者数で除し決定される。次に各被験者について、被験者のAUCと平均AUC間の差の絶対値を決定する。得られた差の絶対値を次に合計して被験者変動を示す値を得る。低い数値ほど被験者間の変動が低いことを表し、高い値ほど被験者間変動が高いことを表す。

【0260】本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は、上記改善特性の2又はそれ以上を有することが好ましい。より好ましくは、本発明の実施形態による混合物中の同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は上記改善特性の3又はそれ以上を有する。最適には、本発明の実施形態による混合物中の同一分子量及び式Aの構造を有する薬物-オリゴマー結合体の混合物は上記改善特性の4つ全てを有する。

【0261】本発明の実施形態による結合体の混合物を含む医薬品組成物も提供される。上記の薬物-オリゴマー結合体の混合物は、既知技術による医薬品キャリアー中投与に関し処方することができる。例えばRemington, The Science And Practice of Pharmacy (第9版, 1995)。本発明の実施形態による医薬品組成物の製造に於いては、薬物-オリゴマー結合体は一般的には、とりわけ薬学上許容できるキャリアーと混合される。キャリアーはもちろん医薬品組成物中のその他添加物と適合するという意味に於いて受け入れ可能でなければならず、患者に対し有害であってはならない。キャリアーは固体でも、又は液体でも、又はその両方でもよく、好ましくは薬物-オリゴマー結合体の混合物と単一投与量製剤、例えば薬物-オリゴマー結合体を0.01又は0.5重量%ないし約9.5重量%又は9.9重量%含むような錠剤として処方される。医薬品組成物は、随意に1又はそれ以上の補助成分を含み、成分を混合することを含むが、これに限定されない医薬品周知の技術により調製することができる。

【0262】本発明の実施形態による医薬品組成物は、経口、直腸、局所、吸入(例えばエアゾール)、バツカル(例えば舌下)、錠、非経口(例えば皮下、筋肉内、皮内、関節内、胸膜内、腹膜内、脳内、動脈内又は静脈

内)、局所(例えば皮膚及び気道表面を含む粘膜表面の両方)及び経皮的投与に好適な組成物を含むが、特定例の最適な経路は治療対象の状態の性質及び重症度、ならびに使用される具体的薬物-オリゴマー結合体の性質に依存する。

【0263】経口投与に好適な医薬品組成物は、それぞれが所定量の薬物-オリゴマー結合体の混合物を、粉末又は顆粒;溶液または水性又は非水性懸濁液;又は水中油型又は油中水型エマルジョンのような形で含む、カプセル、カシェ、ロゼンジ又は錠剤のような分離式単位である。このような製剤は、薬物-オリゴマー結合体の混合物と好適キャリアー(上記のような補助添加物を1又はそれ以上含む)を合わせる段階を含む、調剤に好適な方法により調製される。一般に本発明の実施形態による医薬品組成物は、薬物-オリゴマー結合体の混合物を液体、又は微細に分割された固形キャリアー、あるいはその両方と均一及び徹底的に混合すること、次に必要に応じてえられた混合物を成形することで調製される。例えば、錠剤は薬物-オリゴマー結合体の混合物、及び随意の1またはそれ以上の補助成分を含む粉末又は顆粒を圧縮、又は成形することで調製される。圧縮錠剤は、随意に結合剤、光沢剤、不活性希釈液及び/又は界面活性剤/分散剤と混合された混合物を好適機械により粉末又は顆粒のような自由流体に圧縮することで調製される。成形された錠剤は、好適機械により不活性液体結合剤により湿らされた粉末化合物を成形することで製造される。

【0264】バツカル(舌下)投与に好適な医薬品組成物には、芳香性ベース、通常はショ糖とアカシア又はトラガカントゴム中に薬物-オリゴマー結合体の混合物を含むロゼンジ;及びゼラチンとグリセリン又はショ糖とアカシアのような不活性ベース中に薬物-オリゴマー結合体の混合物を含む錠剤が含まれる。

【0265】非経口投与に好適な本発明の実施形態による医薬品組成物には、薬物-オリゴマー結合体の混合物の無菌水性及び無菌非水性注射液が含まれるが、これら製剤は好ましくは対象のレシピエントの血液に等張である。これら製剤は酸化防止剤、緩衝剤、抗菌剤及び組成物を対象のレシピエントの血液との等張性を付与する溶液を含んでよい。水性又は非水性無菌懸濁液は懸濁化剤及び増量剤をふくんでもよい。組成物は、例えば密封アンプル又はバイアルのような投与単位又は複数投与容器に入れられ、そして例えば食塩水又は注射用水を使用直前に加えるだけでよい様に凍結乾燥(凍結乾燥)状態で保存される。即時調合注射液及び懸濁液は、前記いずれかの無菌粉末、顆粒及び錠剤より調製される。例えば、薬物-オリゴマー結合体の混合物を含む注射可能な安定、無菌組成物は、密封容器中の単位用量の形で提供される。薬物-オリゴマー結合体の混合物は凍結乾燥の形で提供され、それは好適な薬学上許容できるキャリアーにより再生され、被験者への注射に好適な液体組成物を

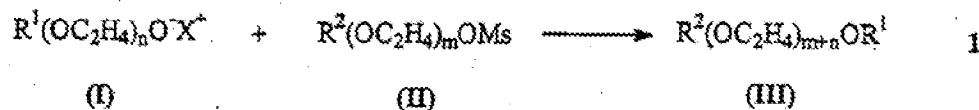
形成する。単位投与体は典型的には薬物-オリゴマー結合体の混合物を約10mgないし約10g含む。薬物-オリゴマー結合体の混合物は本質的には非水溶性であり、生理学的に受け入れ可能な乳化剤を、薬物-オリゴマー結合体の混合物を水性キャリアー中に乳化するのに十分な量で、用いられる。このような有益乳化剤の一つはホスファチジルコリンである。

【0266】直腸投与に好適な医薬品組成物は好ましくは単位投与座薬である。これらは薬物-オリゴマー結合体の混合物を1又はそれ以上の通常の固形キャリアー、例えばココアバターと混合し、得られた混合物を成形することで調製される。

【0267】皮膚への局所適用に好適な医薬品組成物は、好ましくは軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、スプレー、エアゾール、又はオイルの形を取る。使用できるキャリアーにはゼリー、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、経皮増強剤及びその2又はそれ以上の組合せを取る。

【0268】経皮投与に好適な医薬品組成物の例は、長期間にわたりレシビエントの皮膚との接触を維持せしめるのに適した分離式パッチである。経皮投与に適した組成物はイオン泳動(例えばPharmaceutical Research 3(6):318(1986)参照)により供給され、典型的には薬物-オリゴマー結合体の混合物の随意緩衝水溶液の形を取る。好適製剤はクエン酸又はビス/トリス緩衝液(pH6)又はエタノール/水を含み、0.1ないし0.2Mの活性成分を含む。

【0269】このような医薬品組成物の有効量を投与す\*



R<sup>1</sup>はH又は親油性成分である。R<sup>2</sup>は好ましくはH、アルキル、アリールアルキル、芳香族成分、脂肪酸成分、脂肪酸成分のエステル、コレステリル、又はアダマンチルである。R<sup>1</sup>はより好ましくはH、低級アルキル、又は芳香族成分である。R<sup>2</sup>は最適にはH、メチル又はベンジルである。

【0272】式Iでは、nは1ないし25である。好ましくは、nは1ないし6である。

【0273】X<sup>+</sup>は陽イオンである。好ましくはX<sup>+</sup>は、PEG上のヒドロキシル成分をイオン化できる強塩基のような化合物中の陽イオンである。陽イオンの例にはナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン、セシウムイオン及びタリウムイオンが含まれるが、これらに限定されない。

【0274】R<sup>2</sup>はH又は親油性成分である。R<sup>2</sup>は好ましくは直鎖又は枝分かれアルキル、アリールアルキ

\*ることによる治療が必要な被験者のインスリン欠乏を治療する方法も提供される。本発明の範囲内である薬物-オリゴマー結合体の混合物の有効量の使用は混合物間及び患者間により様々であり、患者の年齢や状態、及び供与経路等の要素に依存するだろう。このような投与量は当業者既知の通常の医薬品の方法により決定できる。一般的には、いずれの重量も薬物-オリゴマー結合体の混合物の重量に基づく場合に、約0.1ないし約50mg/kgが治療効果的である。高レベルでの毒性の危険より静脈投与は、全ての重量を活性ベース重量に基づき計算した場合に、例えば約10mg/kgのようなレベルに制限される。経口投与に関しては約10mg/kgないし約50mg/kgの投与量が利用できる。一般的には、筋肉内注射に関しては約0.5mg/kgないし5mg/kgの投与量が使用される。投与回数は通常1日当たり1、2又は3回、又は状態の制御に必要な回数である。あるいは、薬物-オリゴマー結合体は連続注入により投与される。投与時間は治療対象のインスリン欠乏のタイプに拠り、患者の生涯と同じであろう。

【0270】本発明の実施形態による結合体の混合物を合成する方法も提供される。以下の合成経路の実施形態は実質的単分散混合物の合成を目的とするものであるが、同様の合成経路は本発明の実施形態によるその他の結合体の混合物の合成にも利用することができる。

【0271】ポリエチレングリコール成分を含むポリマーの実質的単分散混合物は、反応1に示す如くに与えられる：

【化16】

ル、芳香族成分、脂肪酸成分、又は脂肪酸成分のエステルである。R<sup>2</sup>はより好ましくは低級アルキル、ベンジル、1ないし24個の炭素原子を有する脂肪酸成分、又は1ないし24個の炭素原子を有する脂肪酸成分のエステルである。R<sup>2</sup>は最適にはメチル、1ないし18個の炭素原子を有する脂肪酸、又は1ないし18個の炭素原子を有する脂肪酸のエチルエステルである。

【0275】式IIでは、nは1ないし25である。好ましくは、mは1ないし6である。

【0276】Msはメシレート成分(即ちCH<sub>3</sub>S(O)<sub>2</sub>-)である。

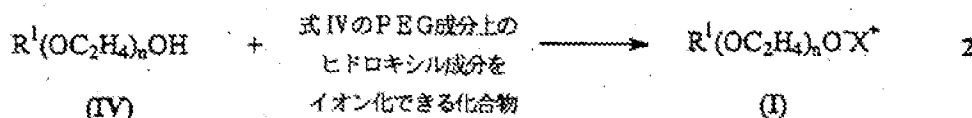
【0277】反応1に例示の如く、式Iの構造を有する化合物の混合物は、式IIの構造を有する化合物の混合物と反応しポリエチレングリコール成分を含み、且つ式IIIの構造を有するポリマーの混合物を提供する。式Iの構造を有する化合物の混合物は実質的単分散の混合

物である。好ましくは、式Iの化合物混合物中の化合物の少なくとも約96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有し、そしてより好ましくは式Iの化合物の混合物は単分散の混合物である。式I Iの化合物の混合物は実質的単分散混合物である。好ましくは、式I Iの化合物混合物中の化合物の少なくとも約96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有し、そしてより好ましくは式I Iの化合物の混合物は単分散の混合物である。式I I Iの化合物の混合物は実質的単分散混合物である。式I I Iの化合物混合物中の化合物の少なくとも約96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有し、より好ましくは式I I Iの化合物の混合物は単分散の混合物である。

【0278】反応1は好ましくは約0℃ないし約45℃の間で実施され、より好ましくは15℃ないし約35℃の間で行われ、最適には室温(約25℃)にて実施される。

【0279】反応1は当業者に知られるような様々な時間実施されるだろう。反応1は好ましくは約0.25、0.5又は0.75時間及び約2、4又は8時間実施される。

\*



に示す如くに調製される。R<sup>1</sup>及びX<sup>+</sup>は上記に同じであり、式IVの化合物の混合物は実質的単分散状態であり、好ましくは式IVの化合物混合物中の化合物の96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有し、そしてより好ましくは式IVの化合物の混合物は単分散の混合物である。

【0283】式IVの化合物のPEG成分上にあるヒドロキシル成分をイオン化できる各種化合物は当業者に知られている。ヒドロキシル成分をイオン化できる化合物は好ましくは強塩基である。より好ましくは、ヒドロキシル成分をイオン化できる化合物は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、t-ブトキシドナトリウム、t-ブトキシドカリウム、ブチルリチウム(BuLi)、及びリチウムジイソプロピルアミンを含む群より選択される。ヒドロキシル成分をイオン化できる化合物はより好ましくは水酸化ナトリウムである。

【0284】式IVの化合物に対する式IVの化合物のPEG成分上にあるヒドロキシル成分をイオン化できる化合物のモル比は、好ましくは少なくとも約1:1であり、そしてより好ましくは少なくとも約2:1である。ヒドロキシル成分をイオン化できる化合物を過剰供与することで、確実に、式IVの化合物の実質全てが反応して式Iの化合物を生じる。即ち、式IVの化合物及び式Iの化合物が共に反応産物中に存在するときに生じる分

\*【0280】反応1は、N、N-ジメチルアセトアミド(DMA)、N、N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサメチルリン酸トリアミド、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン、ジエチルエーテル、メチルt-ブチルエーテル(MTBE)、トルエン、ベンゼン、ヘキサン、ペンタン、N-メチルピロリジノン、テトラヒドロナフタレン、デカヒドロナフタレン、1、2-ジクロロベンゼン、1、3-ジメチル-2-イミダゾリノ、又はその混合物を含むが、これらに限定されない非プロトン性溶媒中にて実施される。より好ましくは、溶媒はDMF、DMA又はトルエンである。

【0281】式I Iの化合物に対する式Iの化合物のモル比は好ましくは約1:1より大きい。より好ましくは、モル比は少なくとも約2:1である。式Iの化合物の過剰を供給することで、式I Iの化合物の実質全てを反応させることができ、これは以下に示す式I I Iの化合物の回収に役立つ。

【0282】式Iの化合物は好ましくは反応2:

【化17】

離に関する困難を回避できる。

【0285】反応2は好ましくは、約0℃ないし約40℃の間で実施され、より好ましくは0℃ないし約35℃の間で行われ、最適には0℃ないし室温(約25℃)にて実施される。

【0286】反応2は当業者に知られるような様々な時間実施されるだろう。反応2は好ましくは約0.25、0.5又は0.75時間及び約2、4又は8時間実施される。

【0287】反応2は、N、N-ジメチルアセトアミド(DMA)、N、N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサメチルリン酸トリアミド、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン、ジエチルエーテル、メチルt-ブチルエーテル(MTBE)、トルエン、ベンゼン、ヘキサン、ペンタン、N-メチルピロリジノン、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロナフタレン、デカヒドロナフタレン、1、2-ジクロロベンゼン、1、3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、又はその混合物を含むが、これらに限定されない非プロトン性溶媒中にて実施される。より好ましくは、溶媒はDMF、ジクロロメタン又はトルエンである。

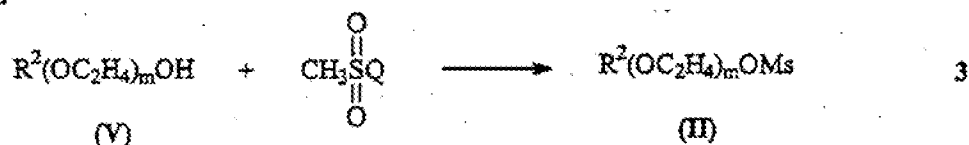
【0288】式I Iの化合物は好ましくは反応3に示す如くに調製される:

30

40

50

【化18】



R<sup>2</sup> 及び Ms は上記に同じであり、式 V の化合物は式 V の化合物の実質的単分散混合物として存在する；好ましくは式 V の化合物混合物中の化合物の少なくとも約 96、97、98、又は 99 パーセントが同一分子量を有し、またより好ましくは式 V の化合物混合物は単分散の混合物である。

【0289】Q はハロゲン化物、好ましくは塩化物又はフッ化物である。

【0290】CH<sub>3</sub>S(O<sub>2</sub>)Q はメタンスルホニルハロゲン化物である。メタンスルホニルハロゲン化物は好ましくは塩化メタンスルホニル又はフッ化メタンスルホニルである。より好ましくは、メタンスルホニルハロゲン化物又は塩化メタンスルホニルである。

【0291】式 V の化合物に対するメタンスルホニルハロゲン化物のモル比は、好ましくは少なくとも約 1：1 より大きく、より好ましくは少なくとも約 2：1 である。フッ化メタンスルホニルの過剰供与により、確実に式 V の化合物の実質全てが反応して式 II の化合物を生じる。即ち、式 V の化合物及び式 II の化合物が共に反応産物混合物中に存在するときに生じる分離に関する困難を回避できる。

【0292】反応 3 は好ましくは、約 -10℃ でないし約 40℃ の間で実施され、より好ましくは 0℃ でないし約 35℃ の間で行われ、最適には 0℃ でないし室温（約 25℃）にて実施される。

【0293】反応 3 は当業者に知られるような様々な時間で実施することができる。反応 3 は好ましくは約 0、\*

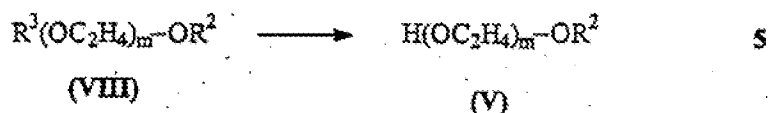
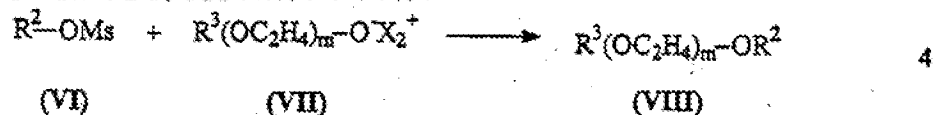
\* 2.5、0.5 又は 0.75 時間及び約 2、4 又は 8 時間実施される。

10 【0294】反応 3 は、モノメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、モノエチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、モノイソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、モノ-n-ブチルアミン、ジオ-n-ブチルアミン、トリ-n-ブチルアミン、モノシクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、又はその混合物を含むが、これに限定されない脂肪族アミンの存在下に実施される。より好ましくは、脂肪族アミンはトリエチルアミンのような第 3 アミンである。

20 【0295】当業者に知られる様に、式 V の化合物の各種の実質的単分散混合物が市販されている。例えば式中の R<sup>2</sup> が H 又はメチルである場合式 V の化合物はそれぞれ PEG 又は mPEG 化合物であり、ウイスコンシン州、ミルウォーキーのアルドリッチ社 (Aldrich)；スイスのフルカ社 (Fluka) 及び/又はオレゴン州、ポートランド (Portland) の TCI アメリカ (America) 社よりそれぞれ販売されている。

【0296】式中の R<sup>2</sup> が例えば、高級アルキル、脂肪酸、脂肪酸のエステル、コレステリル、又はアダマンチルのような親油性成分の場合、式 V の化合物は当業者に理解されうる各種方法により提供される。式 V の化合物は以下の如くに好ましく提供される：

【化19】



R<sup>2</sup> は親油性成分であり、好ましくは高級アルキル、脂肪酸のエステル、コレステリル、又はアダマンチルであり、より好ましくは脂肪酸の低級アルキルエステルであり、より好ましくは 1 ないし 18 個の炭素元素を有する脂肪酸のエチルエステルである。

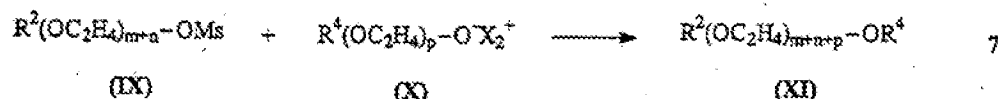
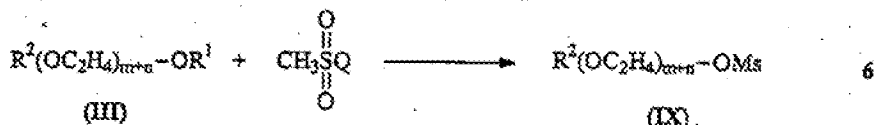
【0297】R<sup>3</sup> は H、ベンジル、トリチル、テトラヒドロピラン、又は当業者に理解されうるその他のアルコール保護基である。

50 【0298】X<sub>2</sub><sup>+</sup> は X<sup>+</sup> に関する上記に記載の陽イオンである。

【0299】mの値は上記に記載のものである。

【0300】反応4に関し、式V Iの化合物の混合物は、反応1に関する上記条件と同様の反応条件の下に式V I Iの化合物の混合物と反応される。式V Iの化合物の混合物は、実質的単分散混合物である。好ましくは式V Iの化合物の混合物中の少なくとも約96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有する。より好ましくは、式V Iの化合物の混合物は単分散の混合物である。式V I Iの化合物の混合物は実質的単分散混合物である。好ましくは、式V I Iの化合物の混合物中の少なくとも約96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有する。より好ましくは、式V I Iの化合物の混合物は単分散の混合物である。

【0301】反応5に関しては、式V I I Iの化合物は当業者に理解されうる各種方法により加水分解され、R\*



Ms、m、nは反応1に関し前記したものである；pはnおよびmと同様であり、そしてX<sub>2</sub><sup>+</sup>は反応1に関し前記されたX<sup>+</sup>と同様である。Qは反応3に関し前記されたものである。R<sup>2</sup>は反応1に関し前記のものと同じであり、好ましくは低級アルキルである。R<sup>1</sup>はHである。反応6は好ましくは反応3に関する前記記載の様式にて実施される。反応7は反応1に関する前記記載のものと同じ方法で実施される。好ましくは式I I Iの化合物混合物中の化合物の少なくとも約96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有し、より好ましくは式I I Iの化合物の混合物は単分散の混合物である。式Xの化合物混合物は実質的単分散混合物である。好ましくは、式Xの化合物混合物中の化合物の少なくとも約96、97、98又は99パーセントが同一分子量を有し、より好ましくは式Xの化合物の混合物は単分散の混合物である。

【0304】これから記述する本発明の実施形態によるプロセスは図1に示す図式に示されている。実質的単分散混合物ポリエチレングリコール含有オリゴマーの合成は、実質的単分散ポリエチレングリコールのモノベンジルエーテル(1)の調製により開始する。過剰量の市販の実質的単分散ポリエチレングリコールを、Coudertら(Synthetic Communications, 16(1):19~26(1986))記載の如くに水酸化ナトリウム水存在下に塩化ベンジルと反応させる。次に、NaHを加え1のナトリウム塩を調製

\*<sup>3</sup> 成分はアルコールに転換される。R<sup>3</sup>がベンジル又はトリチルの場合、加水分解は当業者に周知のパラジウム-チャコール触媒存在下にH<sub>2</sub>を利用して、実施するのが好ましい。R<sup>3</sup>がHの場合には、当然、反応5は不要である。

【0302】式V Iの化合物は反応3に関して前記に記載のように、市販されているか、又は製造される。式V I Iの化合物は反応2に関し前記されたようにして、製造される。

【0303】PEG成分を含み、且つ上記式I I Iの構造を有するポリマーの実質的単分散混合物は、PEG鎖を延長するために更にPEG成分を含むその他の実質的単分散混合物と反応することができる。例えば次の図式を実施できる：

【化20】

し、このナトリウム塩をヒドロキシアリカン酸(2)のエステルより合成されたメシレートと反応させる。メシレートの置換産物(3)は触媒による水素発生により脱ベンジル化され、アルコール(4)を得る。このアルコールのメシレート(5)は塩化メタンスルホニルの添加により製造され、実質的単分散ポリエチレングリコール誘導体のモノメチルエーテルのナトリウム塩との反応に於ける求電子試薬として使用され、これによりオリゴマーのポリエチレングリコール部分は所望長さまで延長され、延長型エステル(6)を得る。エステルは塩基水溶液中で酸(7)に加水分解され、カルボジイミド及びN-ヒドロキシスクシンイミドとの反応により活性化エステル(8)に変換される。図1に例示されたオリゴマーはN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性化されているが、パラ-ニトロフェニルジクロロホルメート、フェニルジクロロホルメート、3, 4-フェニルジクロロホルメート、及び3, 4-フェニルジクロロホルメートのような活性化フェニルジクロロホルメート；トレンシル化及びアセタール形成を含むが、これらに限定されない各種その他作用物質を使用し本発明のオリゴマーを活性化できることが知られている。

【0305】更に図1に関し、qは1ないし24である。好ましくはqは1ないし18であり、より好ましくはqは4ないし16である。R<sup>5</sup>は加水分解によりカルボン酸を与えることができる成分である。R<sup>5</sup>は好ましくは低級アルキルであり、そしてより好ましくはエチル



である。変数  $n$  及び  $m$  は反応 1 に関し記載のものである。

【0306】ここに記載の方法に使用される全ての原料は市販されているか、又は市販材料を使用し当分野公知の方法により製造できる。

【0307】以下本発明を次の実施例を参照し記載する。これらの実施例は本発明の観点を例示することを目的とするものであり、クレームにより規定される発明の範囲を限定するものではないと理解すべきである。

#### 【0308】

##### 【実施例】実施例 1～10

実施例 1～10 の反応は、特記しない限り電磁攪拌機を使用し、窒素下に実施された。「仕上処理 (Work-up)」とは、有機溶媒を使用した抽出、飽和  $\text{NaCl}$  液による有機相の洗浄、乾燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 及び蒸発 (ロータリーエバポレータ) を示す。薄層クロマトグラフィはシリカゲル 60<sup>®</sup> F-254 をプレコートしたメルク (Merck) 社製ガラスプレートを使用して実施され、スポットはヨード蒸気により視覚化された。全てのマススペクトルはコロラド州、高分子資源コロラド州立大学により決定され、 $m/z$  のオーダーで報告されている (相対強度)。元素分析及び融点はテネシー州、ノックスビル (Knoxville) のガルブレイスラボラトリーズ (Galbraith Laboratories, Inc) 社により実施された。実施例 1～10 については、図 2 に示す図式を参照のこと。

#### 【0309】実施例 1

8-メトキシ-1- (メチルスルホニル) オキシ-3, 6-ジオキサオクタン (9)  
非多分散トリエチレングリコールモノメチルエーテル分子 (4, 00 mL, 4, 19 g, 25, 5 mmol) 及びトリエチルアミン (4, 26 mL, 3, 09 g, 30, 6 mmol) の乾燥ジクロロメタン (50 mL) 溶液を水槽中及び窒素雰囲気下に冷却した。乾燥ジクロロメタン (20 mL) の塩化メタンスルホニル液 (2, 37 mL, 3, 51 g, 30, 6 mmol) を添加漏斗より滴下し加えた。塩化物添加終了 10 分後に、反応混合液を水槽より取り出し、室温になるまで放置した。混合液を、TLC (15% MeOH 入り  $\text{CHCl}_3$ ) を溶出液とする) が残存トリエチレングリコールモノメチルエーテルを示さなくなるまで更に 1 時間攪拌した。反応混合液を更に 75 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和  $\text{NaHCO}_3$ 、水及びブラインで連続して洗浄した。有機体を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上に乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮し、透明な油として化合物 9 の非多分散混合物を得た (5, 31 g, 86%)。

#### 【0310】実施例 2

エチレングリコールモノメチルエーテル (10) ( $m=4, 5, 6$ )

$\text{N}_2$  下、乾燥 DMF (25, 7 mL) の非多分散化合物

11 (35, 7 mmol) の攪拌液に  $\text{NaH}$  の 60% 分散油を小分けして加え、混合液を室温で 1 時間、攪拌した。この塩 12 に非多分散メシレート 9 (23, 36) の乾燥 DMF (4 mL) 液を一度に加え、混合液を室温で 3, 5 時間攪拌した。反応の進行を TLC (12%  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$ ) でモニターした。反応混合液を当量の 1 N の  $\text{HCl}$  で希釈し、酢酸エチル (2×20 mL) にて抽出し、廃棄した。水溶液の抽出及び仕上処理により非多分散ポリマー 10 を得た (収率 82~84%)。

#### 【0311】実施例 3

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21-ヘプタオキサドコサノール (10) ( $m=4$ )  
油; Rf 0, 46 (メタノール; クロロフォルム=3:22); MS  $m/z$   $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_8$  に関する理論値 340, 21 ( $M^+ + 1$ )、実測値 341, 2。

#### 【0312】実施例 4

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-オクタオキサペンタコサノール (10) ( $m=5$ )  
油; Rf 0, 43 (メタノール; クロロフォルム=6:10); MS  $m/z$   $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_9$  に関する理論値 384, 24 ( $M^+ + 1$ )、実測値 385, 3。

#### 【0313】実施例 5

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサソクタコサノール (10) ( $m=6$ )  
油; Rf 0, 42 (メタノール; クロロフォルム=6:10); MS  $m/z$   $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_{10}$  に関する理論値 428, 26 ( $M^+ + 1$ )、実測値 429, 3。

#### 【0314】実施例 6

20-メトキシ-1- (メチルスルホニル) オキシ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘプタオキシアエイコサン (14)

非多分散化合物 14 は、9 に関して陳べられたように、量的収率でアルコール 13 ( $m=4$ ) 及び塩化メタンスルホニルから油として得られた。Rf 0, 4 (酢酸エチル; アセトニトリル=1:5); MS  $m/z$   $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$  に関する理論値 433, 21 ( $M^+ + 1$ )、実測値 433, 469。

#### 【0315】実施例 7

エチレングリコールモノメチルエーテル (15) ( $m=3, 4, 5$ )

非多分散化合物 15 は化合物 10 に関する上記方法を用いて、ジオールより調製された。

#### 【0316】実施例 8

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサヘンイサノール (15) ( $m=3$ )  
油; Rf 0, 41 (メタノール; クロロフォルム=6:10); MS  $m/z$   $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_{11}$  に関する理論値 472, 29 ( $M^+ + 1$ )、実測値 472, 29。

#### 【0317】実施例 9

10

20

30

40

50

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33-ウネカキサテトラトリコサノール (15) (m=4)

油; Rf 0.41 (メタノール:クロロホルム=6:10); MS m/z C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>O<sub>12</sub> に関する理論値 516, 31 (M<sup>+</sup>+1)、実測値 516, 31。

#### 【0318】実施例10

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36-ドデカオキサヘプタトリコサノール (15) (m=5)

油; Rf 0.41 (メタノール:クロロホルム=6:10); MS m/z C<sub>33</sub>H<sub>52</sub>O<sub>13</sub> に関する理論値 560, 67 (M<sup>+</sup>+1)、実測値 560, 67。

【0319】実施例11から18については図3に示す図式を参照のこと。

#### 【0320】実施例11

ヘキサエチレングリコールモノベンジルエーテル (16)

3.99g (10.0mmol) のNaOHを4mlの水に溶解し調製された水酸化ナトリウム水溶液をゆっくり非分散ヘキサエチレングリコール (28.175g, 25ml, 10.0mmol) に加えた。塩化ベンジル (3.9g, 30.8mmol, 3.54ml) を加え、反応混合液を攪拌しながら100℃で18時間加熱した。次に反応混合液を冷却し、ブライン (250ml) にて希釈した後、塩化メチレン (200ml×2) にて抽出した。集めた有機層をブラインで1度洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上に乾燥、濾過し真空中で濃縮して暗茶色の油を得た。この粗生成物混合物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、勾配溶出; 酢酸エチルから9/1の酢酸エチル/メタノール) にかけて精製し、黄色の油として収率8.099g (70%) の非分散16を得た。

#### 【0321】実施例12

エチル-6-メチルスルホニルオキシヘキサノエート (17)

非分散エチル6-ヒドロキシヘキサノエート (50, 76ml, 50.41g, 227mmol) の乾燥ジクロロメタン (75ml) 溶液を、氷槽中、窒素雰囲気下に冷却した。トリメチルアミン (34.43ml, 24.99g, 247mmol) を加えた。乾燥ジクロロメタン (75ml) 中の塩化メタンスルホニル (19, 15ml, 28.3g, 247mmol) の溶液を添加漏斗より滴加した。混合液を3.5時間攪拌し、氷槽を溶解しながらゆっくりと室温になるまで放置続けた。混合液をシリカゲルに通し濾過し、濾液を水、飽和NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで連続して洗浄した。有機体をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上に乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮し、黄色の油を得た。粗生成物の最終精製はフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、1/1ヘキサン/酢

酸エチル) によって実施し、透明な無色の油として非分散産物 (46, 13g, 85%) を得た。FAB MS: m/e 239 (M+H), 193 (M-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O)。

#### 【0322】実施例13

6-{2-[2-(2-[2-(2-(2-ベンジルオキシエトキシ)エトキシ]エトキシ)-エトキシ]エトキシ]-ヘキサノン酸エチルエステル (18)

10 水酸化ナトリウム (3.225g又は60%油分散体, 80.6mmol) を無水トルエン80ml中に懸濁し、窒素雰囲気下に置き、氷槽中で冷却した。80ml乾燥トルエン中の非分散アルコール16 (27.3g, 75.3mmol) の溶液をNaH懸濁液に加えた。混合液を0℃にて30分間攪拌し、室温になるまで放置し、更に5時間攪拌したが、この間に溶液は透明な茶色の液になった。80ml乾燥トルエン中の非分散メシレート17 (19.21g, 80.6mmol) の溶液をNaH/アルコール混合液に加え、合わせた液体を室温で3日間攪拌した。反応混合液を50mlのメタノールでクエンチングし、塩基性アルミナを通し濾過した。濾液を真空中で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、勾配溶出液3/1酢酸エチル/ヘキサンから; 酢酸エチル) にかけて精製し、淡黄色の油 (16.52g, 44%) として非分散産物を得た。FAB MS: m/e 515 (M+H)。

#### 【0323】実施例14

6-{2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]エトキシ]-ヘキサノン酸エチルエステル (19) 非分散ベンジルエーテル18 (1.03g, 2.0mmol) を25mlのエタノールに溶解した。この液に270mgの10%Pd/Cを加え、混合液を水素雰囲気下に置き、TLCが材料の完全な消失を示すまで、4時間攪拌した。反応混合液をCelite 545を通し濾過し、触媒を除き、濾液を真空中で濃縮し無色の油 (0.67g, 79%) として非分散型の表題化合物を得た。FAB MS: m/e 425 (M+H), 447 (M+Na)。

#### 【0324】実施例15

6-{2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-メチルスルホニルエトキシ)エトキシ]エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]エトキシ]-ヘキサノン酸エチルエステル (20) 非分散アルコール19 (0.835g, 1.97mmol) を3.5mlの乾燥ジクロロメタンに溶解し、窒素雰囲気下に置いた。トリエチルアミン (0.301ml, 0.219g, 2.16mmol) を加え、混合液を氷槽中で冷却した。2分後、塩化メタンスルホニル (0.16ml, 0.248g, 2.16mmol) を

加えた。混合液を0℃で15分間攪拌し、続いて室温で2時間攪拌した。反応混合液を塩化トリエチルアンモニウムを除去するため、シリカゲルを通し濾過し、濾液を連続的に水、飽和NaHCO<sub>3</sub>、水及びブラインで洗浄した。有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上に乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、9/1酢酸エチル/メタノール）にかけ精製し、透明な油として非多分散化合物20（0.819g、83%）を得た。FAB MS:m/e 503（M+H）

#### 【0325】実施例16

6-〔2-〔2-〔2-〔2-〔2-〔2-（2-メトキシエトキシ）エトキシ〕エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕エトキシ〕-ヘキサノン酸エチルエステル（21）NaH（60%の油中分散液88mg、2.2mmol）を無水トルエン（3ml）にN<sub>2</sub>下で懸濁し、0℃まで冷却した。トルエンとの共沸蒸留により乾燥された非多分散ジエチレングリコールモノメチルエーテル

（0.26ml、0.26g、2.2mmol）を加えた。反応混合液を室温まで温め、4時間攪拌し、この間、濁った灰色の懸濁液は透明な黄色になり、続いて茶色に変わった。メシレート20（0.50g、1.0mmol）の2.5ml乾燥トルエン液を加えた。一晚室温で攪拌した後、2mlのメタノールを加え反応液をクエンチングし、得られた液体をシリカゲルを通し濾過した。濾液は真空中で濃縮された。FAB MS:m/e 499（M+H）、521（M+Na）。分取クロマトグラフィー（シリカゲル、19/3クロロホルム/メタノール）による追加精製は透明な黄色の油として非多分散産物を提供した（0.302g、57%）。FAB MS:m/e 527（M+H）、549（M+Na）。

#### 【0326】実施例17

6-（2-〔2-〔2-〔2-〔2-〔2-（2-メトキシエトキシ）エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕エトキシ〕-ヘキサノン酸（22）非多分散エステル（0.25g、0.46mmol）を0.71mlの1NのNaOH中、18時間攪拌した。18時間後、混合物をアルコールを除去するため、真空中で濃縮し残渣を更に10mlの水に溶解した。水溶液を2NのHClを用いてpH2に酸性化し、生成物をジクロロメタン（30ml×2）に抽出した。有機相を集めて、ブリアンで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上に乾燥、濾過し、真空中で濃縮して黄色の油として非多分散の表題化合物を得た（0.147g、62%）。FAB MS:m/e 499（M+H）、521（M+Na）。

#### 【0327】実施例18

6-（2-〔2-〔2-〔2-〔2-〔2-（2-メトキシエトキシ）エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕エトキシ〕-ヘキサノン酸2,5-ジオキシ

-ビロリジン-1-イルエステル（23）

非多分散酸22（0.209g、0.42mmol）を4mlの乾燥ジクロロメタンに溶解し、乾燥フラスコ内に前もって入れておいたNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）（57.8mg、0.502mmol）及びEDC（1-3-（ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩）（98.0mg、0.502mmol）にN<sub>2</sub>雰囲気下で加えた。溶液を室温で一晩攪拌し、過剰の試薬と、EDCより形成された尿素とを除去するため、シリカゲルで濾過した。濾液を真空中で濃縮して暗黄色の油として非多分散産物（0.235g、94%）を得た。FAB MS:m/e 596（M+H）、618（M+Na）。

【0328】実施例19から24については図4に示した図式を参照のこと。

#### 【0329】実施例19

トリエチレングリコールモノメチルエーテルのメシレート（24）

氷槽中にて0℃に冷却されたCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>（100ml）の溶液に非多分散トリエチレングリコールモノメチルエーテル（25g、0.15mol）を加えた。次にトリエチルアミン（29.5ml、0.22mol）を加え、そして溶液を15分間、0℃にて攪拌し、続いて塩化メタンスルホン（13.8ml、0.18mol、20mlのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に溶解）を滴加した。反応混合液を30分間、0℃にて攪拌し、室温まで温めた後2時間攪拌した。粗反応混合液をCelite（〜200mLのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>にて洗浄）を通し濾過し、H<sub>2</sub>O（300mL）、5%NaHCO<sub>3</sub>（300mL）、H<sub>2</sub>O（300mL）、飽和NaCl（300mL）にて洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、蒸発により乾燥させた。次に油を真空ライン上に2時間まで置き確実に乾燥させ、黄色の油として非多分散の表題化合物を得た（29.15g、収率80%）。

#### 【0330】実施例20

ヘプタエチレングリコールモノメチルエーテル（25）非多分散テトラエチレングリコール（51.5g、0.27mol）のTHF（1L）溶液にカリウムt-ブトキシド（14.8g、0.13mol、30分以内で少量あて）を加えた。次に反応混合液を1時間攪拌し、続いてTHF（90mL）に溶解された24（29.15g、0.12mol）を滴加し、反応混合液を一晩攪拌した。粗反応混合液はCeliteで濾過され（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>にて洗浄、〜200mL）、真空中で乾燥した。次に油をHCl（250mL、1N）に溶解し、酢酸エチル（250mL）で洗浄して過剰の24を除いた。残った24を除くために、酢酸エチル（125mL）による追加洗浄が必要なこともある。25の大部分が水相から除かれるまで、水相をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>（125mL、1N）にて繰り返し洗浄した。初回抽出は24、25及び

2結合体副産物を含み、HCl (125mL容積) にて後抽出しなければならなかった。有機体をまとめ、真空中で乾燥した。次に得られた油をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mL) で溶解し、繰り返しH<sub>2</sub>O (50mL容積) にて25が除かれるまで洗浄した。水分画を集め、総量500mLとし、NaClを溶液が濁るまで加え、続いてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> にて(2×500mL) 洗浄した。有機相を集め、MgSO<sub>4</sub> にて乾燥し、蒸発して乾燥させ油として非分散の表題化合物を得た(16.9g、収率41%)。高純度を保証するためには、更に1又はそれ以上の段階の精製操作を繰り返すことが望ましい。

#### 【0331】実施例21

8-プロモオクタネート(26)  
エタノール(100mL)中の8-プロモオクタノ酸(5.0g、22mmol)溶液に、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.36mL、7.5mmol)を加え、反応液を加熱し攪拌しながら3時間還流した。粗反応混合液を室温まで冷却し、H<sub>2</sub>O (100mL)、飽和NaHCO<sub>3</sub> (2×100mL)、H<sub>2</sub>O (100mL) にて洗浄し、MgSO<sub>4</sub> で乾燥、蒸発により乾燥させ透明な油を得た(5.5g、収率98%)。

#### 【0332】実施例22

MPEG7-C8エステルの合成(27)  
非分散化合物25(3.0g、8.8mmol)のエーテル(90mL)溶液にカリウムt-ブトキシド(1.2g、9.6mmol)を加え、反応混合液を1時間攪拌した。続いてエーテル(10mL)に溶解された非分散化合物26(2.4g、9.6mmol)を滴加し、反応混合液を一晩攪拌した。粗反応混合液をCeliteで濾過し(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> にて洗浄、~200mL)、真空中で乾燥した。得られた油を酢酸エチルに溶解し、H<sub>2</sub>O (100mL) にて洗浄、MgSO<sub>4</sub> で乾燥、蒸発により乾燥させた。カラムクロマトグラフィー(シリカ、酢酸エチルから酢酸エチル/メタノール、10:1)を実施し、非分散の表題化合物を透明な油として得た(0.843g、収率19%)。

#### 【0333】実施例23

MPEG7-C8酸(28)  
非分散化合物27の油(0.70g、1.4mmol)に1NのNaOH(2.0mL)を加え、反応混合液を4時間攪拌した。粗反応混合液を濃縮し、酸性化(pH2以下)、NaClにて飽和し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> にて洗浄(2×50mL)した。有機相をまとめ、飽和NaClにて洗浄、MgSO<sub>4</sub> で乾燥、蒸発させて乾燥して、透明な油として非分散の表題化合物を得た(0.35g、収率53%)。

#### 【0334】実施例24

MPEG7-C8酸の活性化(29)  
非分散MPEG7-C8-酸28(0.31g、0.64mmol)を3mLの無水塩化メシレートに溶解

し、次にN-ヒドロキシスクシンイミド(0.079g、0.69mmol)及びEDCl-HCl(135.6mg、0.71mmol)の無水塩化メシレート液に加えた。反応液を数時間攪拌し、1NのHCl、水にて洗浄、MgSO<sub>4</sub> で乾燥して濾過し、濃縮した。粗物質をカラムクロマトグラフィーにて精製し、濃縮して非分散の表題化合物を透明な油として得て、真空中で乾燥した。

【0335】実施例25から29については、図5に示す図式を参照のこと。

#### 【0336】実施例25

10-ヒドロキシデカノエート(30)  
非分散10-ヒドロキシデカノ酸(5.0g、26.5mmol)のエタノール(100mL)溶液にH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.43mL、8.8mmol)を加え、反応液を加熱し、攪拌しながら3時間還流した。粗反応混合液を室温まで冷却し、H<sub>2</sub>O (100mL)、飽和NaHCO<sub>3</sub> (2×100mL)、H<sub>2</sub>O (100mL) にて洗浄し、MgSO<sub>4</sub> で乾燥、蒸発により乾燥させ透明な油として非分散表題化合物を得た(6.9g、収率98%)。

#### 【0337】実施例26

10-ヒドロキシデカノエートのメシレート(31)  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (27mL)溶液に非分散10-ヒドロキシデカノエート30(5.6g、26mmol)を加え、水槽中に0℃まで冷却した。次にトリエチルアミン(5mL、37mmol)を加え、反応混合液を15分間、0℃にて攪拌した。続いてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3mL)に溶解した塩化メタンスルホン(2.7mL、24mmol)を加え、反応混合液を0℃にて30分間攪拌し、水槽を取り外して反応液を更に2時間、室温で攪拌した。粗反応液をCeliteで濾過し(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、80mLにて洗浄)、濾液をH<sub>2</sub>O (100mL)、5%NaHCO<sub>3</sub> (2×100mL)、H<sub>2</sub>O (100mL)、飽和NaCl (100mL) にて洗浄し、MgSO<sub>4</sub> で乾燥、蒸発して乾燥させ黄味を帯びた油として非分散表題化合物を得た(7.42g、収率97%)。

#### 【0338】実施例27

MPEG7-C<sub>10</sub> エステル(32)  
非分散ヘプタエチレングリコールモノメチルエーテル25(2.5g、7.3mmol)のテトラヒドロフラン(100mL)溶液に水素化ナトリウム(0.194g、8.1mmol)を加え、反応混合液を1時間攪拌した。続いてテトラヒドロフラン(10mL)に溶解された非分散型10-ヒドロキシデカノエート31(2.4g、8.1mmol)を滴加し、反応混合液を一晩攪拌した。粗反応混合液をCeliteで濾過し(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> にて洗浄、~200mL)、真空中で乾燥した。得られた油を酢酸エチルに溶解し、H<sub>2</sub>O (2

×200mL)にて洗浄、MgSO<sub>4</sub>で乾燥、蒸発して乾燥させ、カラムクロマトグラフィー(シリカ、酢酸エチル/メタノール、10:1)にかけて非多分散の表題化合物を透明な油として得た(0.570g、収率15%)。

#### 【0339】実施例28

MPEG<sub>7</sub>-C<sub>18</sub> 酸(33)

非多分散化合物mPEG<sub>7</sub>-C<sub>18</sub> エステル32の油(0.570g、1.1mmol)に1NのNaOH(1.6mL)に加え、反応混合液を一晩攪拌した。粗反応混合液を濃縮し、酸性化(pH2以下)、NaClにて飽和し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>にて洗浄(2×50mL)した。有機層を集め、飽和NaCl(2×50mL)にて洗浄、MgSO<sub>4</sub>で乾燥、蒸発して乾燥して、透明な油として非多分散の表題化合物を得た(0.340g、収率62%)。

#### 【0340】実施例29

MPEG<sub>7</sub>-C<sub>18</sub> 酸の活性化(34)

非多分散の酸33を実施例24に記載の方法と同様の方法を用い活性化した。

【0341】実施例30から31については、図6に示す図式を参照のこと。

#### 【0342】実施例30

C<sub>18</sub> (PEG6)オリゴマー(36)の合成

非多分散の塩化ステアロイル35(0.7g、2.31mmol)をゆっくりとPEG6(5g、17.7mmol)及びピリジン(0.97g、12.4mmol)のベンゼン混合液に加えた。反応混合液を数時間(〜5)攪拌した。反応液を酢酸エチル/メタノールを展開剤に用いたTLCにかけた。次に反応混合液を水で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥、真空中で濃縮、乾燥させた。精製された非多分散化合物36はFABMS:m/e549/M<sup>+</sup>Hにより分析された。

#### 【0343】実施例31

C<sub>18</sub> (PEG6)オリゴマーの活性化

C<sub>18</sub> (PEG6)オリゴマーの活性化は2段階で実施された：

1) 非多分散のステアロイル-PEG36(0.8g、1.46mmol)をトルエンに溶解し、氷槽中に冷却されたホスゲン液(10mL、20%トルエン液)に加えた。反応混合液を1時間、0℃に攪拌し、次に3時間、室温で攪拌した。次にホスゲンとトルエンを蒸留して除き、残った非多分散型ステアロイルPEG6クロロホルメート37をP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で一晩乾燥した。

2) 非多分散型ステアロイルPEG6クロロホルメート36(0.78g、1.27mmol)及びTEA(128mg、1.27mmol)の無水塩化メチレンの溶液にN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の塩化メチレン液を加えた。反応混合液を16時間攪拌し、次に水で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥し、濾過、真空により

濃縮、乾燥し非多分散型活性化C<sub>18</sub> (PEG6)オリゴマー38を得た。

【0344】実施例32から37については、図7に示す図式を参照のこと。

#### 【0345】実施例32

テトラエチレングリコールモノベンジルエーテル(39)

非多分散型テトラエチレングリコール(19.4g、0.10mmol)の油にNaOH(4.0mL中に4.0g)を加え、反応液を15mm攪拌した。次に塩化ベンジル(3.54mL、30.8mmol)を加え、反応混合液を100℃に加熱し、一晩攪拌した。反応混合液を室温まで冷却し、飽和NaCl(250mL)にて希釈し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2×200mL)で洗浄した。有機層を集めて、飽和NaClで洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥、クロマトグラフィー(シリカ、酢酸エチル)にかけて黄色の油として非多分散の表題化合物を得た(6.21g、収率71%)。

#### 【0346】実施例33

20 テトラエチレングリコールモノベンジルエーテルのメシレート(40)

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(27mL)溶液に非多分散テトラエチレングリコールモノベンジルエーテル39(6.21g、2.2mmol)を加え、氷槽中にて0℃まで冷却した。次にトリエチルアミン(3.2mL、24mmol)を加え、反応混合液を15分間、0℃にて攪拌した。続いてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2mL)に溶解した塩化メタンスルホン(1.7mL、24mmol)を加え、反応混合液を0℃にて30分間攪拌し、氷槽を取り外して反応液を更に2時間、室温で攪拌した。粗反応液をCeliteで濾過し(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、80mLにて洗浄)、濾液をH<sub>2</sub>O(100mL)、5%NaHCO<sub>3</sub>(2×100mL)、H<sub>2</sub>O(100mL)、飽和NaCl(100mL)にて洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。得られた黄色の油を活性炭(10g)を含有するシリカのパッドで、クロマトグラフィーにかけ、透明な油(7.10g、収率89%)として非多分散の表題化合物を得た。

#### 【0347】実施例34

オクタエチレングリコールモノメチルエーテル(41)水素化ナトリウム(0.43g、18mmol)を含むテトラヒドロフラン(140mL)溶液に、非多分散型テトラエチレングリコール(3.5g、18mmol)のテトラヒドロフラン(10mL)液を滴加し、反応混合液を1時間攪拌した。続いてテトラヒドロフラン(10mL)に溶解された非多分散テトラエチレングリコールモノベンジルエーテルのメシレート40(6.0g、16.5mmol)を滴加し、反応混合液を一晩攪拌した。粗反応混合液をCeliteを通して濾過し(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>にて洗浄、250mL)、濾液をH<sub>2</sub>Oにて洗浄、MgSO<sub>4</sub>で乾燥、蒸発して乾燥させた。得られた

油をクロマトグラフィー（シリカ、酢酸エチル／メタノール、10：1）及びクロマトグラフィー（シリカ、クロロホルム／メタノール、25：1）にかけ、透明な油として非多分散の表題化合物を得た（2.62 g、収率34%）。

#### 【0348】実施例35

ステアレートMPEG8-ベンジルの合成（43）

非多分散オクタエチレングリコールモノメチルエーテル41（0.998 g、2.07 mmol）及びピリジン（163.9 g、2.07 mmol）の攪拌冷却液に、非多分散塩化ステアロイル42（627.7 mg、2.07 mmol）のベンゼン液を加えた。反応混合液を一夜（18時間）攪拌した。翌日、反応混合液を水で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥、真空中で濃縮、乾燥した。次に粗産物をフラッシュシリカゲルカラムで、10%メタノール／90%クロロホルムを用いたクロマトグラフィーにかけた。産物を含む分画を集め、真空により濃縮、乾燥して非多分散の表題化合物を得た。

#### 【0349】実施例36

ステアレートPEG8-ベンジルの水素化分解

非多分散ステアレートPEG8-Bz143（0.854 g、1.138 mmol）のメタノール溶液にPd/C（10%）（パラジウム、活性炭上に10%重量）を加えた。反応混合液を一夜（18時間）水素下に攪拌した。次に、溶液を10%メタノール／90%クロロホルムを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーにかけ、濃縮、濃縮、精製し、R<sub>f</sub> = 0.6の分画を集め、濃縮、乾燥して非多分散酸44を得た。

#### 【0350】実施例37

C<sub>18</sub>（PEG8）オリゴマーの活性化

非多分散ステアレートPEG8オリゴマーの2段階活性化は、上記実施例31のステアレートPEG6に關し記載されたように実施され、非多分散活性化C<sub>18</sub>（PEG8）オリゴマー45を得た。

#### 【0351】実施例38

活性化トリエチレングリコールモノメチルオリゴマーの合成

以下の記述については図8に示す図式を参照のこと。ホスゲン20%（100 mL、約18.7 g、189 mmolホスゲン）を含むトルエン溶液をN<sub>2</sub>雰囲気下で0℃まで冷却した。非多分散mTEG（トリエチレングリコール、モノメチルエーテル、7.8 g、47.5 mmol）を25 mLの無水酢酸エチルに溶解し、冷却ホスゲン液に加えた。混合液を1時間、0℃で攪拌し、次に室温まで温めるために放置し、さらに2時間半攪拌した。残存ホスゲン、酢酸エチル及びトルエンを真空蒸留により除き、透明な油状残渣として非多分散mTEGクロロホルムート46を残した。非多分散残渣46を50 mLの乾燥ジクロロメタンに溶解し、これにTEA（トリエチルアミン、6.62 mL、47.5 mmol）及

びNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド、5.8 g、50.4 mmol）を加えた。混合液を乾燥雰囲気下に室温で20時間攪拌し、この間に大量の白色の沈殿が出現した。混合液を濾過してこの沈殿を除き、真空中で濃縮した。得られた油47をジクロロメタン中に集め、冷脱イオン水にて2回、1NのHClにて2回、そしてブラインにて1回洗浄した。有機相をMgSO<sub>4</sub>上で乾燥し、濾過、濃縮し透明な明るい黄色の油として非多分散表題化合物を得た。必要に応じて、NHSエステルはEtOAcを溶出液に使用するシリカゲルを利用したフラッシュクロマトグラフィーにより更に精製できる。

#### 【0352】実施例39

活性化バルチミテートTEGオリゴマーの合成

以下の記述については、図9に示す図式を参照のこと。非多分散バルミチン無水物（5 g、10 mmol）を乾燥THF（20 mL）に溶解し、室温で攪拌した。攪拌中の溶液に3モルの過剰のピリジンを加え、続いて非多分散トリエチレングリコール（1.4 mL）を加えた。反応混合液を1時間攪拌した（反応の進行はTLC：酢酸エチル／クロロホルム、3：7にてモニターした）。反応終了時にTHFを除去し、産物を10%のH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>と混合し、酢酸エチル抽出を行った（3×30 mL）。まとめた抽出物は水、ブラインで連続洗浄し、MgSO<sub>4</sub>上に乾燥、蒸発して非多分散産物48を得た。N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート（3 mmol）のDMF（~10 mL）溶液を、非多分散産物48（1 mmol）の無水DMF溶液10 mLに攪拌しながら加えた。水素化ナトリウム（3 mmol）をゆっくり反応混合液に加えた。反応混合液を数時間（例えば5時間）攪拌した。ジエチルエーテルを加え活性化オリゴマーを沈殿させた。この過程を3回繰り返す、最後に産物を乾燥した。

#### 【0353】実施例40

活性化ヘキサエチレンモノメチルオリゴマーの合成

以下の記述については図10に示す図式を参照のこと。非多分散活性化ヘキサエチレンモノメチルエーテルは上記実施例39の非多分散トリエチレングリコールと同様に調製された。20%ホスゲンのトルエン溶液（35 mL、6.66 g、67.4 mmolホスゲン）をN<sub>2</sub>雰囲気下、氷／塩槽にて冷却した。非多分散ヘキサエチレングリコール50（1.85 mL、2.0 g、6.74 mmol）を5 mLの無水EtOAcに溶解し、シリッジを使ってホスゲン液に加えた。反応混合液を氷槽中に1時間攪拌し続けた後、これを取り出し更に室温で2.5時間攪拌した。ホスゲン、EtOAc及びトルエンは真空蒸留にて取り除き、透明な油状残渣として非多分散化合物51を得た。非多分散残渣51を20 mLの乾燥ジクロロメタン中に溶解し、乾燥した不活性雰囲気下に置いた。トリエチルアミン（0.94 mL、0.68 g、6.7 mmol）及び続いてNHS（N-ヒドロ

キシスクシンイミド、0.82 g、7.1 mmol)を加え、反応混合液を室温で18時間攪拌した。混合液をシリカゲルを通して濾過し、白色の沈殿を除き、真空中で濃縮した。残渣をジクロロメタン中に集め、冷水で2回、1 NのHClで2回、そしてブラインで1回洗浄した。有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上にて乾燥し、濾過、濃縮した。最終精製はフラッシュクロマトグラフィーにより行い(シリカゲル、EtOAc) UV活性のある非多分散NH<sub>5</sub>エステル52を得た。

#### 【0354】実施例41

ポリペプチド-オリゴマー結合体の合成

本発明によるポリペプチド-オリゴマー結合体の混合物は、以下のように合成される。ポリペプチド混合物を無水DMFで溶解する。次にTEA及び実施例18、24、29、31、37、39又は40の活性化オリゴマー無水混合液の混合物を加える。次に反応混合物を攪拌、1時間攪拌するのが好ましい。反応混合物を酸性化する(例えば、0.1% TFA水溶液を2 mL加えることによる)。反応液をHPLCにかける。反応混合物を分取液体クロマトグラフィーにより濃縮、精製する(例えば、Waters PrepLC™ 4000RP Vydac C<sub>18</sub> プロテインペプチドを使用、1×25カラム、水/0.1% TFA入りアセトニトリル、280 nmにて検出)。モノ結合体または多結合体に相当するピークを単離する。サンプルはMALDI-MSにて分析される。

#### 【0355】実施例42

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは副腎皮質刺激ホルモンペプチドである。

#### 【0356】実施例43

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはアドレナメチュリンペプチドである。

#### 【0357】実施例44

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはアラトスタチンペプチドである。

#### 【0358】実施例45

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはアミリンペプチドである。

#### 【0359】実施例46

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはアミロイドβタンパク質フラグメントペプチドである。

#### 【0360】実施例47

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはアンジオテンシンペプチドである。

#### 【0361】実施例48

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは抗生物質ペプチドである。

#### 【0362】実施例49

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは抗原性ポリペプチドである。

#### 【0363】実施例50

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは抗微生物ペプチドである。

#### 【0364】実施例51

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはアポトーシス関連ペプチドである。

#### 【0365】実施例52

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは心房性ナトリウム利尿ペプチドである。

#### 10 【0366】実施例53

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは囊細胞ペプチドである。

#### 【0367】実施例54

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはボンベシンペプチドである。

#### 【0368】実施例55

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは骨GLAペプチドである。

#### 【0369】実施例56

20 実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはブラジキニンペプチドである。

#### 【0370】実施例57

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは脳ナトリウム利尿ペプチドである。

#### 【0371】実施例58

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはCペプチドである。

#### 【0372】実施例59

30 実施例41の方法が実施し、ポリペプチドはC型ナトリウム利尿ペプチドである。

#### 【0373】実施例60

サケカルシトニン150 mg g (MW3432, 0.043 mmol)を無水DMF30 mLに溶解した。次に無水THF (2 mL)中のTEA (35 µL)及び実施例24の活性化オリゴマー (42 mg 0.067 mmol)を加えた。その反応物を1時間攪拌し、次に0.1% TFA水溶液2 mLで酸性化した。引き続きHPLCを行った。次にその反応混合物を分取液体クロマトグラフィー (Waters PrepLC™ 44000 RC Vydac C<sub>18</sub> プロテインペプチド、1×25カラム、水/0.1% TFA入りのアセトニトリル、280 nmで検出)により、濃縮、精製した。モノ結合体及び二結合体に相当する2ピークを単離した。サンプルはMALDI-MSで分析した。PEG7-オクトチル-sCTに関するMS、モノ結合体:3897。PEG7-オクトチル-sCTに関するMS、2結合体:4361。同様の方法で、サケカルシトニンと実施例29の活性化オリゴマーを結合した。PEG7-デシル-sCTに関するMS、モノ結合体:3926。PEG7-デシル-sCTに関するMS、二結合体:4420。同様の



方法で、サケカルシトニンと実施例31の活性化オリゴマーを結合した。ステアリン酸塩-PEG6-sCTに関するMS、モノ結合体：4006。ステアリン酸塩-PEG6-sCTに関するMS、二結合体：4582。同様の方法で、サケカルシトニンと実施例37の活性化オリゴマーを結合した。ステアリン酸塩-PEG8-sCTに関するMS、モノ結合体：4095。同様の方法で、サケカルシトニンと実施例18、38、39及び40の活性化オリゴマーを結合する。

【0374】実施例61

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはカルシトニン遺伝子関連ペプチドである。

【0375】実施例62

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはCARTペプチドである。

【0376】実施例63

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはカソモルフィンペプチドである。

【0377】実施例64

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは走化性ペ

【0378】実施例65

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはコレシストキニンペプチドである。

【0379】実施例66

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはコルチコトロピン放出因子ペプチドである。

【0380】実施例67

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはコルチスタチンペプチドである。

【0381】実施例68

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはデルモルフィンペプチドである。

【0382】実施例69

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはダイノルフィンペプチドである。

【0383】実施例70

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはエンドルフィンペプチドである。

【0384】実施例71

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはエンドセリンペプチドである。

【0385】実施例72

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはETA受容体拮抗ペプチドである。

【0386】実施例73

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはETb受容体拮抗ペプチドである。

【0387】実施例74

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはエンケフ

リンペプチドである。

【0388】実施例75

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはフィブロネクチンペプチドである。

【0389】実施例76

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはガラニンペプチドである。

【0390】実施例77

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはガストリンペプチドである。

【0391】実施例78

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはグルカゴンペプチドである。

【0392】実施例79

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはGn-RH会合ペプチドである。

【0393】実施例80

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドは成長因子ペプチドである。

【0394】実施例81

ヒト成長ホルモンを図10に示す様に実施例40の活性化オリゴマーに結合した。セローノオフランドルフ、マサチューセッツ (serono of Randolph, Massachusetts) より商品名 Saizen<sup>TM</sup> にて販売されているヒト成長ホルモン (注射用ソマトトロピン (rDNA起源)) を、hGHが0.58mmol濃度に成る様にDMSOに溶解した。TEA (278当量) を加え、溶液を約10分間攪拌した。2当量、5当量又は30当量の活性化ヘキサエチレングリコール52を、0.2Mの活性化オリゴマーのドライTHF溶液より加えた。反応液を室温で45分~1時間攪拌した。各反応混合液の一部を0.1% TFA水溶液600μLでクエンチングした。2ポリマー当量と5ポリマー当量反応混合液と非結合型hGHとのHPLC比較を図14に示す。30ポリマー当量反応液のHPLC分析は図15に示す。質量分光器分析のサンプルは、逆相C<sub>18</sub> カラムと水/アセトニトリル勾配を利用した分析用HPLCにより精製された。2当量ポリマー反応混合液に由来するピーク全体を集め、濃縮してMALDI質量分光器により分析した。この材料のマススペクトルは、モノ結合体、2結合体、3結合体及び4結合体型hGH及び残存の未反応hGHの存在を証明した (図16)。5当量反応混合液を図17に示す極性に従い、粗精製した。濃縮分画 (図18、図19及び図20) のMALDIマススペクトルは、タンパク質の結合レベルが保持時間に伴い増すことを示した。図21の分画Eのエレクトロスプレーマススペクトルの結果は、6結合hGHの存在と一致した。30当量反応混合液由来のピーク全体を集め、濃縮した。図22のエレクトロスプレーマススペクトル分析は、10及びそれより多い結合体物

質を示した。同様の方法を用い、hGHを実施例18、24、29、31又は37の活性化オリゴマーに結合した。

#### 【0395】実施例82

活性化バルミチン酸-TEGオリゴマーを用いたヒト成長ホルモン-オリゴマー結合体の合成

実施例39の活性化ポリマーを用い、上記実施例81の方法に類似した操作を行った。結合の進行は、結合反応混合液20 $\mu$ Lをバイアルに取り、100 $\mu$ Lの0.1%TFA-水-IPA(1:1)で希釈して、HPLCによりチェックし、その結果を図23に示した。2時間後、0.1%TFA-水を加えて反応をクエンチングした。結合産物は分取(pre-p.)HPLCにより精製された。

#### 【0396】実施例83

活性化TEGオリゴマーによるヒト成長ホルモン-オリ\*

時間	mL/分	溶媒A	溶媒B
0	3.5	80	20
55	3.5	0	100

【0398】ブールした分画を凍結乾燥し白色の粉末を得た。化合物のマスペクトルを図26及び27に示す。同様の操作を9当量のTEAと9当量の実施例39の活性化オリゴマーを用い実施した。結合産物は図28に示す様に、C<sub>18</sub> カラムを使った分取HPLCにより精製された。

#### 【0399】実施例84

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはGTP-結合タンパク質ペプチドである。

#### 【0400】実施例85

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはグアニンペプチドである。

#### 【0401】実施例86

実施例41の操作が実施され、ポリペプチドはインヒンペプチドである。

#### 【0402】実施例87

インスリン-オリゴマー結合体の合成

ヒトインスリン(亜鉛又は無亜鉛、2g、乾燥重量ベースで0.344mmol)の22 $\pm$ 4℃の25mLジメチルフルホキシド(純度>99%)液に8mLのトリエチルアミン(純度>99%)を加えた。得られた混合液を5から10分間、22 $\pm$ 4℃で攪拌した。上記に素早く上記実施例18の活性化オリゴマー(0.188g、※

#### \*ゴマー結合体の合成

セローノフランドルフ、マサチューセッツより商品名Saizen<sup>TM</sup>にて販売されているヒト成長ホルモン(注射用ソマトトロピン(rDNA起源))をDMSOに溶解し(1mg/125 $\mu$ L)、室温で2~4分間攪拌した。2当量のTEAを加え、更にTHFに溶解された実施例38の活性化オリゴマーを2当量加えた。2時間後、0.1%TFA-水を加えて反応をクエンチングした。結合産物は図24に示す様に、分取HPLCにより精製された。同様の操作を、5当量のTEA及び5当量の実施例39の活性化オリゴマーにも行った。結合産物は図25に示す様に、C<sub>18</sub> カラムを使用した分取HPLCにより精製された。移動相及び溶出時間は次の通りであった。

#### 【0397】

#### 【表1】

時間	mL/分	溶媒A	溶媒B
0	3.5	80	20
55	3.5	0	100

※100%活性化をベースに0.36mmol)の7、5mLアセトニトリル液を攪拌しながら22 $\pm$ 4℃にて加えた。溶液を45分間攪拌し、温度を27℃より低く維持しながら酢酸液を使いクエンチングした。反応は分析HPLCによりモニターされた。この反応条件により、B29-位置で単結合されたPEG-ヘキシル-インスリン(PEG-ヘキシル-インスリン、B29モノ結合体)が収率40~60%で生じた。粗反応混合液(PEG-ヘキシル-インスリン、B29単結合、40~60%、未反応インスリン8~25%、関連物質15~35%)を透析又は2重濾過し(3000~3500分子量切りすて、MWCO)、有機溶媒及び小分子量の不純物を除き、酢酸アンモニウム緩衝液に対し交換した後、凍結乾燥した。B29位置で単結合したPEG-ヘキシル-インスリンの結合反応は分析用HPLCによりモニターされた。この分析HPLC法はWaters Delta-Pak C<sub>18</sub> カラム、150 $\times$ 3.9mm I.D.、5 $\mu$ m、300Åを使用した。溶媒系は、溶媒B:50/50メタノール/水中の0.1%TFAの溶液及び溶媒D:0.1%TFAメタノール液より構成された。勾配系は以下の通りである:

#### 【0403】

#### 【表2】

時間(分)	溶媒B%	溶媒D%	流速(mL/分)
開始(0)	100	0	1.00
20	40	60	1.00
25	100	0	1.00

【0404】同様の操作を利用し、実施例24、29、31、37、38、39及び40の活性化オリゴマーを使ったインスリン結合体の非多分散混合物を与えた。

【0405】実施例88

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはインターロイキンペプチドである。

【0406】実施例89

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはレプチンペプチドである。

【0407】実施例90

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはロイコトキニペプチドである。

【0408】実施例91

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは黄体形成ホルモン放出ホルモンである。

【0409】実施例92

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはマストランペプチドである。

【0410】実施例93

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはMCDペ 20

プチドである。

【0411】実施例94

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはメラノ細胞刺激ホルモンペプチドである。

【0412】実施例95

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはモルフィセプチンペプチドである。

【0413】実施例96

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはモチリンペプチドである。

【0414】実施例97

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは神経ペプチドである。

【0415】実施例98

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは神経ペプチドYペプチドである。

【0416】実施例99

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは神経向性因子ペプチドである。

【0417】実施例100

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはオレキシンペプチドである。

【0418】実施例101

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはオビオイドペプチドである。

【0419】実施例102

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはオキシトシンペプチドである。

【0420】実施例103

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはPACA 50

Pペプチドである。

【0421】実施例104

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはバクレアスタチンペプチドである。

【0422】実施例105

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは膵臓ポリペプチドである。

【0423】実施例106

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは副甲状腺ホルモ 10

ンペプチドである。

【0424】実施例107

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは副甲状腺ホルモ ン関連ペプチドである。

【0425】実施例108

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはペプチドTペプチドである。

【0426】実施例109

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはプロラクチン放 出ペプチドである。

【0427】実施例110

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはペプチドYYペ 15

プチドである。

【0428】実施例111

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはレニン嫌質ペ 20

プチドである。

【0429】実施例112

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはセクレチンペ 25

プチドである。

【0430】実施例113

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはソマトスタチン 30

ペプチドである。

【0431】実施例114

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはサブスタンスP 35

ペプチドである。

【0432】実施例115

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはタキキニンペ 40

プチドである。

【0433】実施例116

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは甲状腺刺激ホル 45

モン放出ホルモンペプチドである。

【0434】実施例117

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはトキシ 50

ンペプチドである。

【0435】実施例118

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドは血管作動性腸管 55

ペプチドである。

【0436】実施例119

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはバソプレ 60

ッシンペプチドである。

【0437】実施例120

実施例41の方法が実施され、ポリペプチドはウイルス関連ペプチドである。

#### 【0438】実施例121

粗混合物からのB29変性型PEG7-ヘキシルーインスリン、モノ結合体の精製

PEG7-ヘキシルーインスリン、B29単結合型を実施例87の粗混合物より、分取HPLCシステムを使用し精製した。凍結乾燥した粗混合物(0.5g、組成物：PEG7-ヘキシルーインスリン、B29単結合型、40~60%、未反応インスリン8~25%、関連物質15~35%)を5~10mLの0.01M酢酸\*

\*アンモニウム緩衝液、pH7.4に溶解し、0.5%トリエチルアミン/0.5%リン酸緩衝液TEAP A)で平衡化したC-18逆相HPLCカラム(150×3.9mm)にかけた。カラムをTEAP A及びTEAP B(80%アセトニトリル及び20%TEAP A)溶媒系を使った勾配流により溶出した。粗混合物からのPEG7-ヘキシルーインスリン、B29単結合型の調製HPLC精製の勾配系は以下の通りである：

#### 【0439】

【表3】

時間(秒)	TEAP A%	TEAP B%	流速(mL/分)
開始(0)	70	30	30
45	64	36	30
105	60	40	30
115	40	60	30
125	15	85	30
135	15	85	30

【0440】分画はHPLCにより分析され、PEG7-ヘキシルーインスリン、B29単結合型の純度>97%の産物分画をプールした。溶出緩衝液及び溶媒は酢酸アンモニウム緩衝液(0.01M、pH7.4)に対する透析又は二重濾過(MWCO3000~3500)により除かれ、酢酸アンモニウム緩衝液に交換され、凍結乾燥されPEG7-ヘキシルーインスリン、B29単結合型(純度>97%)の白色粉末を得た。

※

20※【0441】実施例87で反応のモニタリングに使用した方法と同一のカラムと溶媒システムを使った分析HPLC法を使用し、PEG7-ヘキシルーインスリン、B29モノ結合体の分析を行った。しかし、勾配条件は以下の通りであった：

#### 【0442】

【表4】

時間(分)	溶媒B%	溶媒D%	流速(mL/分)
開始(0)	100	0	1.00
30	10	90	1.00
35	100	0	1.00

#### 【0443】実施例122

ヒトインスリン-オリゴマー結合体の混合物に関する分散係数の決定

ヒトインスリン-オリゴマー結合体の分散係数は以下の如くにして決定された。ヒトインスリン-オリゴマー結合体の混合物を、例えば、上記実施例87に記載のように準備した。混合物の第1サンプルはHPLCにより精製され、サンプル中の各種ヒトインスリン-オリゴマー結合体が分離され、単離された。各単離分画が結合体の純粋な単分散の混合物を含むとすると、「n」は集められた分画の数に等しい。混合物は1又はそれ以上の以下の結合体を含み、それらは結合位置とそれに続く結合の程度により表記されている：Gly<sup>A1</sup> モノ結合体；Phe<sup>B1</sup> モノ結合体；Lys<sup>B29</sup> モノ結合体；Gly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup> 2結合体；Gly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B29</sup> 2結合体；Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup> 2結合体；及び/又はGly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup> 3結合体で

ある。混合物の各単離分画は質量分光器により分析され、分画の大きさが決定され、それぞれ単一、二又は三結合体に分類され、サンプル中の各結合体について変数「M」を表す値が与えられた。混合物の第2サンプルはHPLCにより分析され、HPLCトレースが提供される。モル吸光度が結合の結果として変化することはないとすると、混合物中の特定結合体の重量%は、問題の結合体に相当するHPLCトレースのピーク下面積に対応することで、HPLCトレースの全ピーク下面積に対する割合として提供される。サンプルが集められ、凍結乾燥され、サンプル中の無水g重量を決定する。サンプルのg重量をサンプル中の各成分の重量%を乗することで、サンプル中の各結合体のg重量が決定された。変数「N<sub>i</sub>」は、特定結合体(i番目結合体)については、サンプル中の特定結合体のg重量をその特定結合体の質量、上記決定されたM<sub>i</sub>、で除し、その商にアボガドロ数(6.02205×10<sup>23</sup> モル<sup>-1</sup>)を乗する

ことで決定され、サンプル中の問題の結合体の分子数、 $N_1$ 、を与える。次に各結合体について決定された $n$ 、 $M$ 、及び各結合体について決定された $N_1$ を用い、分散係数が計算される。

#### 【0444】実施例123

インスリンーオリゴマー結合体のサイトセンサー研究  
18時間、血清欠乏状態に置かれたC o l o 2 0 5 (A T T C由来の結腸直腸腺癌細胞、カタログ番号# C L L - 2 2 2) 細胞を3:1のサイトセンサー低緩衝液R P M I - 1 6 4 0 培地:サイトセンサーアガロース捕捉培地に懸濁し、サイトセンサーカプセルカップに100, 000細胞/10 $\mu$ L小滴の割合で播種した。細胞はサイトセンサー上において、ベースライン酸性化率が安定するまで100 $\mu$ L/分の流速にて、低緩衝液R P M I - 1 6 4 0 培地に約3時間平衡化された。インスリン薬物(インスリン又はインスリン結合体)を低緩衝液R P M I - 1 6 4 0 培地を使い50 nMに希釈し、細胞に100 $\mu$ L/分の速度で20分間適用させた。暴露後、薬物液を取り除き、細胞を再度低緩衝液培地のみの連続流下に灌流した。データ収集は酸性化率がベースラインレベルに戻るまで続けた(薬物液の投与後約1時間)。結果は図29に示す。図29に用いる限り、インスリンはヒトインスリンである; P E G 4 はm P E G 4 -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の非多分散混合物である; P E G 1 0 はm P E G 1 0 -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の非多分散混合物である; P E G 7 はm P E G 7 -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の非多分散混合物である; P E G 7<sub>avg</sub> はm P E G 7<sub>avg</sub> -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の多分散混合物である。

#### 【0445】実施例124

インスリンーオリゴマー結合体の酵素安定性  
キモトリプシン消化はリン酸緩衝液、pH 7.4、37℃にて、振動水槽中で行われた。インスリン/インスリン結合体濃度は0.3 mg/mLであった。キモトリプシン濃度は2単位/mLであった。100 $\mu$ Lのサンプルを指定時間に取り出し、25 $\mu$ Lの0.1%トリフルオロ酢酸:イソプロピルアルコールの1:1混合液を使いクエンチングした。サンプルは逆相H P L Cにて分析され、インスリン/インスリン結合体の相対濃度が、曲線下面積を計算することで決定された。図30に使用する限りは、インスリンはヒトインスリンである; P E G 4 はm P E G 4 -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の非多分散混合物である; P E G 1 0 はm P E G 1 0 -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の非多分散混合物である; P E G 7 はm P E G 7 -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の非多分散混合物である; P E G 7<sub>avg</sub> はm P E G 7<sub>avg</sub> -ヘキシルーインスリン、B 2 9モノ結合体の多分散混合物である。

#### 【0446】実施例125

インスリンーオリゴマー結合体の用量依存活性  
製剤の評価に適した有効な動物モデルは正常の絶食ビーグル犬を使用する。これらのイヌには各種製剤の有効性を評価する目的で、0.25 mg/kgないし1.0 mg/kgのインスリン結合体が投与される。本モデルは本発明によるインスリン結合体が、本発明の一部を構成しない比較目的のために与えられた多分散インスリン結合体に比べ、用量依存的にグルコースレベルを低下することを示した。イヌを使った実験のプロトコルでは、イヌに投与する直前の0時点に於ける血糖測定を必要とする。次に固体経口投与形状をした製剤がイヌの口腔内に挿入される。15、30、60、及び120分時に採血され、グルコースレベルが測定されグラフが作製される。グルコースレベルが低ければ低いほど、インスリン結合体の活性はよくなる。図31では、本発明の結合体のグルコース低下、即ち活性が用量依存的であることが示されている。比較目的として図32は、本発明の一部を構成しない、カプセル形状の多分散インスリン結合体のグルコース低下は本発明の結合体に比べ用量依存性に劣ることを示している。

#### 【0447】実施例126

インスリンーオリゴマー結合体の活性と被験者間変動  
製剤評価の有効な動物モデルは絶食ビーグル犬を使用する。これらのイヌには各種製剤の有効性を評価する目的で、0.25 mg/kgのインスリン結合体が投与される。本モデルは本発明によるインスリン結合体が、本発明の一部を構成しない比較目的のために与えられた多分散インスリン結合体に比べ、低い被験者間変動とより良好な活性を与えることを示すために使用された。イヌを使った実験のプロトコルでは、イヌに投与する直前の0時点に於ける血糖測定を必要とする。次に経口液体投与製剤がイヌの口腔内の背側に適用される。各場合において、イヌはこの溶液を0.25 mg/kg投与された。15、30、60、及び120分時に採血され、グルコースレベルが測定されグラフが作製される。グルコースレベルが低ければ低いほど、インスリン結合体の活性はよくなる。図33、34及び35には、P E G 4 -ヘキシルーインスリン、モノ結合体; P E G 7 -ヘキシルーインスリン、モノ結合体; 及びP E G 1 0 -ヘキシルーインスリン、モノ結合体について得られた結果がそれぞれ示されており、これら本発明のP E G結合体が、図36に示される本発明の一部を構成しない多分散P E G 7<sub>avg</sub> -ヘキシルーインスリンモノ結合体に比べ、被験者間変動が低く、そして活性が高いことが示されている。

#### 【0448】実施例127

カルシトニンーオリゴマー結合体のサイトセンサー(登録商標)研究  
米国標準培養コレクションより得たT-47/D細胞(乳腺癌細胞株)をランニング緩衝液(カリフォルニ

10

20

30

40

50

ア、サニーバールのモレキュラーデバイス社製低緩衝性、無血清、無重炭酸-RPMI 1640培地)  $1 \times 10^7$  細胞/mLの密度に懸濁した。約100,000細胞を10  $\mu$ Lのアガロース細胞捕捉培地滴上に固定化し、サイトセンサーカプセルカップ内に2枚の3  $\mu$ mポリカーボネートメンブレンの間に挟んだ。次に、サイトセンサーカプセルカップをサイトセンサー(登録商標)マイクロフィジオメーター上のセンサーチャンパー内に置かれたサイトセンサーカプセルカップをpH感受検出器に非常に接近させ、固定した。次に流れが停止し、10 センサーチャンパー内のランニング緩衝液の酸性化が測定される30秒間を除いて、ランニング緩衝液をポンプし、100  $\mu$ Lの流速で細胞を横切らせる。酸性化率は2分ごとに決定された。センサーチャンパーの温度は37℃であった。細胞は実験開始前2~3時間センサーチャンパー内に平衡化され、この間にベースラインの酸性化率がモニターされた。次に細胞はランニング緩衝液で希釈された各種nM濃度の試験化合物(サケカルシトニン、又はオクチル-D<sub>1</sub>-カルシトニン)に曝された。試験化合物への細胞の暴露は、合計20分の繰り返しパターンにおける各2分間のポンプサイクル中、最初の40秒間であった。これにより試験化合物に細胞を十分に暴露することができ、細胞代謝に於ける受容体伝達反応を惹起し、続くほぼ50秒間は化合物を含まないランニング緩衝液が流される。この操作により、酸性化率測定前にセンサーチャンパーから試験液(ランニング緩衝液に比べ若干低pHである)を濯ぎ洗う。即ち、酸性化率はそれだけで細胞活性の測定値である。同様の操作を用いて、PEG7-オクチル-sCT、モノ結合体(オクチル-モノ)；PEG7-デシル-sCT、モノ結合体(デシル-モノ)；PEG7-デシル-sCT、2結合体(デシル-D<sub>1</sub>)；ステアレート-PEG6-sCT、モノ結合体(PEG6-St.モノ)へ；及びステアレート-PEG8-sCT、モノ結合体(PEG8-St.モノ)についてのデータを得た。データは、\*

表1

PEG7-オクチル-サケカルシトニン、2結合体の  
0.5 U/mLキモトリプシン消化後の残存%

時間	非製剤化				緩衝化製剤		
15	63	71	68	69	88	86	88
30	34	48	50	46	73	88	86
60	6	15	20	15	61	69	84
	対照				対照		
60	104	88	97	103	116	104	101

【0451】

\*各サイトセンサーチャンパー酸性化率図に関する曲線下面積(AUC)を計算することで、化合物の相対活性について分析され、そして同一実験条件下に行われた複数回の実験の平均AUC測定値を示す図37に示す棒グラフにプロットされた。

## 【0449】実施例128

カルシトニン-オリゴマー結合体の酵素安定性

凍結乾燥粉末として供給された化合物は10 mMのリン酸緩衝液、pH 7.4に懸濁され、次にHPLCによる濃度測定にかけられた。リン酸緩衝液を用いて各特定の胃酵素の活性に最適なpHを有する溶液が作製される。こうして調製された化合物の一部を1.7 mLの微量遠心チューブに移し、37℃の水槽内に15分間振動させ、化合物を温度に対し平衡化させる。15分後、適度な濃度の胃酵素2  $\mu$ Lを各チューブに加え、所望の最終濃度を得る。キモトリプシン及びトリプシンは1 mMのHClに懸濁される。また、対照として化合物は2  $\mu$ Lの1 mMのHClで処理される。その直後に、100  $\mu$ Lのサンプルを対照チューブから取り出し、25  $\mu$ Lのキモトリプシン/トリプシンエンチング液(1:1 1% TFA:イソプロパノール)を用いてエンチングする。このサンプルをT=0分とする。サンプリング操作を、使用する胃酵素に応じ様々な時間間隔で繰り返す。キモトリプシンについては15、30及び60分サンプルを取る。トリプシンでは30、60、120及び180分サンプルを取る。全ての時点のサンプルが採取し終わったら、対照チューブから最終サンプルを取り、分解が温度又は緩衝液に関係しないことを確認する。キモトリプシン及びトリプシンサンプルはHPLCバイアル中に直接集められている。RP-HPLC(アセトニトリル勾配)を用いて、各サンプルについてAUCを決定し、T=0分の対照に基づき%分解を計算する。結果を下表1ないし4に示す。

## 【0450】

【表5】

【表6】

表2  
サケカルシトニンの0.5 U/mLキモトリプシン消化後の残存%  
(比較目的：本発明の一部でない)

時間	非製剤化					緩衝化製剤		
10	73							
15	-	55	62	35	66	59	91	92
30	30	26	40	13	42	54	86	87
60	1.6	5	12	1	12	55	82	85
	対照					対照		
60	-	100	93	45	100	102	98	103

【0452】

\* \* 【表7】

表3  
PEG7-オクチル-サケカルシトニン、2結合体の  
1 U/mLトリプシン消化後の残存%

時間	非製剤化			
30	87	89	83	90
60	78	86	76	85
120	72	82	68	78
180	-	81	61	73
	対照			
60		103	100	
120	106	105	99	
180		104	99	

【0453】

\* \* 【表8】

表4  
サケカルシトニンの1 U/mLトリプシン消化後の残存%  
(比較目的；本発明の一部でない)

時間	非製剤化			
30	80	50	82	87
60	66	28	69	76
120	44	7	46	59
180	-	2	31	46
	対照			
60		41	101	
120	69	16	102	
180		7	101	

【0454】実施例130

カルシトニン-オリゴマー結合体の活性及び被験者間変動

体重20-25gの雄のCF-1マウス(Charles River, Raleigh, NC)を照明(L:Dサイクル, 12:12, 0600時点灯)、温度(21~23℃)及び湿度(40~60%相対湿度)が調整されたノベックス(Nobex)動物施設内にて飼育された。動物は自由に研究食(PM1栄養学)及び水道水を摂らせた。マウスは実験日前48~72時間飼育条件に順応させた。投与前、マウスは一晩絶食させ、水は自

由に与えた。マウスは各時点で無作為に5匹ずつの群に分けられ、本発明によるPEG7-オクチル-sCT、2結合体(オクチルD1)又は比較目的のサケカルシトニン(sCT又はカルシトニン)が一回経口投与された。経口投与は胃管栄養針(Popper #18、ハブからベベルまで5cm)を使い、10mL/kgの割合で、次表の0.2 µg/mLリン酸緩衝化PEG-オクチル-sCT、2結合体製剤を利用し投与された。

【0455】

【表9】



成分	量
PEG7-オクチル-sCT, 2 結合体	20 $\mu$ g
ナトリウムコラーゲン	2.5g
ナトリウムデキストラン	2.5g
ナトリウムリン酸緩衝液、100mM、pH7.4	100g まで十分に

【0456】緩衝化製剤は、80 mLのリン酸緩衝液を清浄な、風袋既知のガラス製ビーカーに加え調製された。コラーゲンナトリウムをゆっくりリン酸緩衝液に、溶解するまで攪拌しながら加えた。デキストラン（dextran）を次に加え、溶解するまで攪拌し続けた。PEG7-オクチル-sCT、2 結合体の20  $\mu$ g当量液を加えた。最後に残ったリン酸緩衝液を加え、最終重量を100gにした。賦形剤対照マウスを全ての実験に使用した。用量-反応曲線を薬物投与後の単一時点60分を使用し作製した。これら曲線を図38-41に示す。適当な時点でマウスをエーテル麻酔し、大静脈を外に取り出し、血液サンプルを25ゲート

表5

\*ジ針の付いた注射器にて採取した。血液の一部は22℃で、1時間凝固させ、血清を取り出し、清浄な容器に入れた。総血清カルシウムは、キャリブレーションされたVitros DT6011分析装置を使い、各動物毎に決定された。血清カルシウムデータはプロットされ、薬物動態パラメータはシグマプロットソフトウェア（4.1版）を用い曲線適合技術により決定された。平均値及び標準偏差（又は標準誤差）を計算し、プロットして投与群間の差の有効性を決定した。各種結合体に関する平均血清カルシウムデータを表5に示す。

【0457】

【表10】

結合体	分散性	2.0 $\mu$ g/kg 投与最時のベースラインカルシウム減少%
PEG7-オクチル-sCT, 2 結合体	単分散混合物	21.0
ステアレート-PEG6-sCT, 2 結合体	単分散混合物	16.0
PEG7-デシル-sCT, モノ結合体	単分散混合物	11.5
ステアレート-PEG8-sCT, 2 結合体	単分散混合物	11.0
PEG7-デシル-sCT, 2 結合体	単分散混合物	8.3

【0458】上記実施例50において決定されたインビボ活性は、PEG7-オクチル-sCT及びPEG7-デシル-sCT単一及び2-結合体のインビボ活性に同等ではないが、ステアレート-PEG6-sCT、2 結合体及びステアレート-PEG8-sCT、2 結合体は明らかにインビボ活性を持ち（表5よりベースラインのカルシウム%の減少により明らか）、PEG7-オクチル-sCT及びPEG7-デシル-sCT、単一及び2-結合体に観察されたインビボ活性と同等であることが分かる。特別な理論に結びつける意図はないが、これら結合体はインビボにて加水分解され、活性型サケカルシトニン又は活性型サケカルシトニン-PEG結合体を提供することを示唆する。

【0459】実施例131

アッセイは次の様にして行う：

細胞培養：既報の如く、完全長のヒトGHRを発現している安定クローンを293細胞で作製し（ヒト腎臓胚細胞株）、293GHRと命名した。

転写アッセイ：これらは最少TKプロモーターとルシフェラーゼに融合したStat5-結合要素（LHRE）を一過性にトランスフェクションされた既報の293G

HR細胞にて行われた。β-ガラクトシダーゼ発現ベクターをトランスフェクション対照として共トランスフェクションし、ルシフェラーゼ値をβ-ガラクトシダーゼ活性について補正した。トランスフェクション後16時間目に細胞を無血清培地に移し、GH又はアゴニストで6時間処理した。ルシフェラーゼ活性は、反復実験間の比較を可能にするための特異的実験内でGHにより刺激された最大活性の%として報告される。GHにより刺激された最大活性はGHにより刺激された重複誘導、即ち非刺激状態の細胞の補正ルシフェラーゼ値で除したGH刺激細胞内の補正ルシフェラーゼ値である。アッセイの結果は図42ないし43に示されるが、ゲノトロピンはヒト成長ホルモン（標準物質、本発明の一部ではない）であり、GH-002は2当量のmTEG結合体、GH-003は5当量のmTEG結合体、GH-004は5当量のmTEG結合体、プロットhGHはヒト成長ホルモン（標準物質、本発明の一部ではない）及びhGH-TEGは9当量のmTEG結合体である。

【0460】明細書では、発明の典型的な好適実施形態が開示されており、特定の用語が使用されているがそれらは一般的かつ記載的意味にのみ使用されており、前記

のクレームに記載される発明の範囲を限定することを目的としていない。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明の実施形態による、ポリエチレングリコール成分及び脂肪酸成分を含む活性化ポリマーの混合物を合成することに関する図式を描写している。

【図2】図2は本発明の実施形態によるmPEGの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図3】図3は本発明の実施形態による活性化mPEG 7-ヘキシルオリゴマーの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図4】図4は本発明の実施形態による活性化mPEG 7-オクチルオリゴマーの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図5】図5は本発明の実施形態による活性化mPEG 7-デシルオリゴマーの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図6】図6は本発明の実施形態による活性化ステアリン酸エステル-PEG 6-オリゴマーの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図7】図7は本発明の実施形態による活性化ステアリン酸エステル-PEG 8-オリゴマーの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図8】図8は本発明の実施形態による活性化PEG 3-オリゴマーの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図9】図9は本発明の実施形態による活性化パルミチン酸エステル-PEG 3-オリゴマーの混合物を合成することに関する図式を例示している。

【図10】図10は本発明の実施形態による活性化PEG 6オリゴマーの混合物を合成すること、及びヒト成長ホルモンと本発明の実施形態による活性化PEG 6オリゴマーとを結合することに関する図式を例示している。

【図11】図11は本発明の実施形態による各種プロピレングリコールモノマーを合成することに関する図式を例示している。

【図12】図12は本発明の実施形態による各種プロピレングリコールポリマーを合成することに関する図式を例示している。

【図13】図13は本発明の実施形態による各種プロピレングリコールポリマーを合成することに関する図式を例示している。

【図14】図14は、2当量の活性化MPEG 6オリゴマー及び5当量の活性化MPEG 6オリゴマーを使用した場合、図10に例示の結合反応のHPLCトレース（HPLC勾配：30分間中に50%ないし90%アセトニトリル）である。

【図15】図15は、30当量の活性化MPEG 6オリゴマーを使用した場合、図10に例示の結合反応のHPLCトレース（HPLC勾配：20分間中に0%ない

し95%アセトニトリル）である。

【図16】図16は、2当量の活性化MPEG 6オリゴマーを使用した図10に例示された結合反応のMALDIスペクトルである。

【図17】図17は、5当量の活性化MPEG 6オリゴマーを使用した図10に例示の結合反応産物の部分精製を示すHPLCトレース（HPLC勾配：30分間中に50%ないし70%アセトニトリル）である。

【図18】図18は、図17に例示の部分精製からの分画BのMALDIスペクトルである。

【図19】図19は、図17に例示の部分精製からの分画CのMALDIスペクトルである。

【図20】図20は、図17に例示の部分精製からの分画Dのエレクトロスプレースペクトルである。

【図21】図21は、図17に例示の部分精製分画EのMALDIスペクトルである。

【図22】図22は、30当量の活性化MPEG 6オリゴマーを使用した図10に例示の結合反応に由来する反応混合物のエレクトロスプレースペクトルである。

【図23】図23は、ヒト成長ホルモンと図9の活性化オリゴマーとの結合のHPLCトレースである。

【図24】図24は、本発明の一部を形成しないヒト成長ホルモンのHPLCトレースと比較した、1当量のヒト成長ホルモンと2当量の本発明による図9の活性化オリゴマーを用いた結合反応のHPLCトレースである。

【図25】図25は、本発明の一部を形成しないヒト成長ホルモンのHPLCトレースと比較した、1当量のヒト成長ホルモンと5当量の本発明による図8の活性化オリゴマーを用いた結合反応のHPLCトレースである。

【図26】図26は、図25の結合HPLCトレース内にあるピークの左半分に相当する分画のMALDIスペクトルである。

【図27】図27は、図25の結合HPLCトレース内にあるピークの右半分に相当する分画のMALDIスペクトルである。

【図28】図28は、本発明の一部を形成しないヒト成長ホルモンのHPLCトレースと比較した、1当量のヒト成長ホルモンと9当量の本発明による図8の活性化オリゴマーを用いた結合反応のHPLCトレースである。

【図29】図29は、比較のみを目的として提供され、本発明の一部を形成しない多分散結合体の混合物とインスリンと比較した、本発明の実施形態によるインスリン-オリゴマー結合体の混合物に関する、化合物の活性の指標を提供するサイトセンサー（登録商標）マイクロブイジオメーターを使って得た結果の比較を示す。

【図30】図30は本発明の実施形態によるインスリン-オリゴマー結合体のキモトリプシン分解と、比較目的のみに提供され、発明の一部を形成しないインスリン-オリゴマー結合体の多分散性混合物との比較を示す。

【図31】図31は、本発明によるmPEG 7-ヘキシ

ルーインスリン、モノ結合体の絶食ビーグル犬の血漿グルコースに及ぼす影響を示す。

【図32】図32は、比較を目的とした、本発明の一部を形成しないmPEG7<sub>ms</sub>-ヘキシルーインスリンモノ結合体の多分散性混合物が絶食ビーグル犬の血漿グルコースに及ぼす影響を示す。

【図33】図33は、絶食ビーグル犬に投与された本発明の実施形態によるmPEG4-ヘキシルーインスリンモノ結合体の混合物の被験者間変動を示す。

【図34】図34は、絶食ビーグル犬に投与された本発明の実施形態によるmPEG7-ヘキシルーインスリンモノ結合体の混合物の被験者間変動を示す。

【図35】図35は、絶食ビーグル犬に投与された本発明の実施形態によるmPEG10-ヘキシルーインスリンモノ結合体の混合物の被験者間変動を示す。

【図36】図36は、比較を目的として、絶食ビーグル犬に投与された本発明の一部を形成しないmPEG7<sub>ms</sub>-ヘキシルーインスリンの多分散性混合物の被験者間変動を示す。

【図37】図37は、比較目的のみのために提供された、発明の一部を形成しない非結合型カルシトニンを使った本発明の実施形態によるカルシトニン-オリゴマー結合体の各種単分散の混合物に関する平均AUCsの比較を示す。

\*

\*【図38】図38は比較を目的として提供された、本発明の一部を形成しないカルシトニンに対する本発明の実施形態によるmPEG7-オクチルーカルシトニン2結合体の混合物についての、最大可能反応の割合として反応が測定された場合の、用量-反応曲線を示す。

【図39】図39は、本発明の実施形態によるmPEG7-オクチルーカルシトニン2結合体の混合物の経口投与後の用量-反応曲線を示す。

【図40】図40は、本発明の実施形態によるmPEG7-オクチルーカルシトニン2結合体の混合物の皮下投与後の用量-反応曲線を示す。

【図41】図41は、比較を目的として提供され、本発明の一部でないサケカルシトニン皮下投与後の用量-反応曲線を示す。

【図42】図42は、比較のみを目的とし、本発明の一部を形成しないヒト成長ホルモン標準体の活性と比較した、本発明の実施形態による成長ホルモン結合体の混合物のルシフェラーゼアッセイにより決定された活性を示す棒グラフを示す。

【図43】図43は、比較のみを目的とし、本発明の一部を形成しないヒト成長ホルモン標準体の活性と比較した、本発明の実施形態による成長ホルモン結合体の混合物のルシフェラーゼアッセイにより決定された活性を示す棒グラフを示す。

【図2】

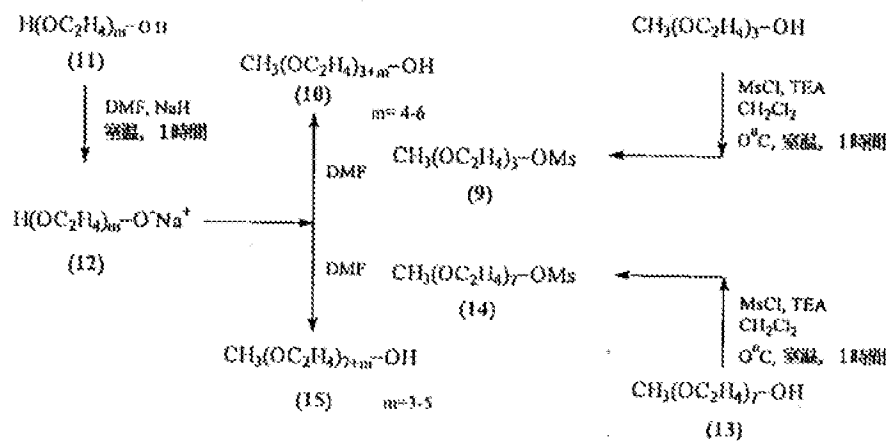


Figure 2

【図1】

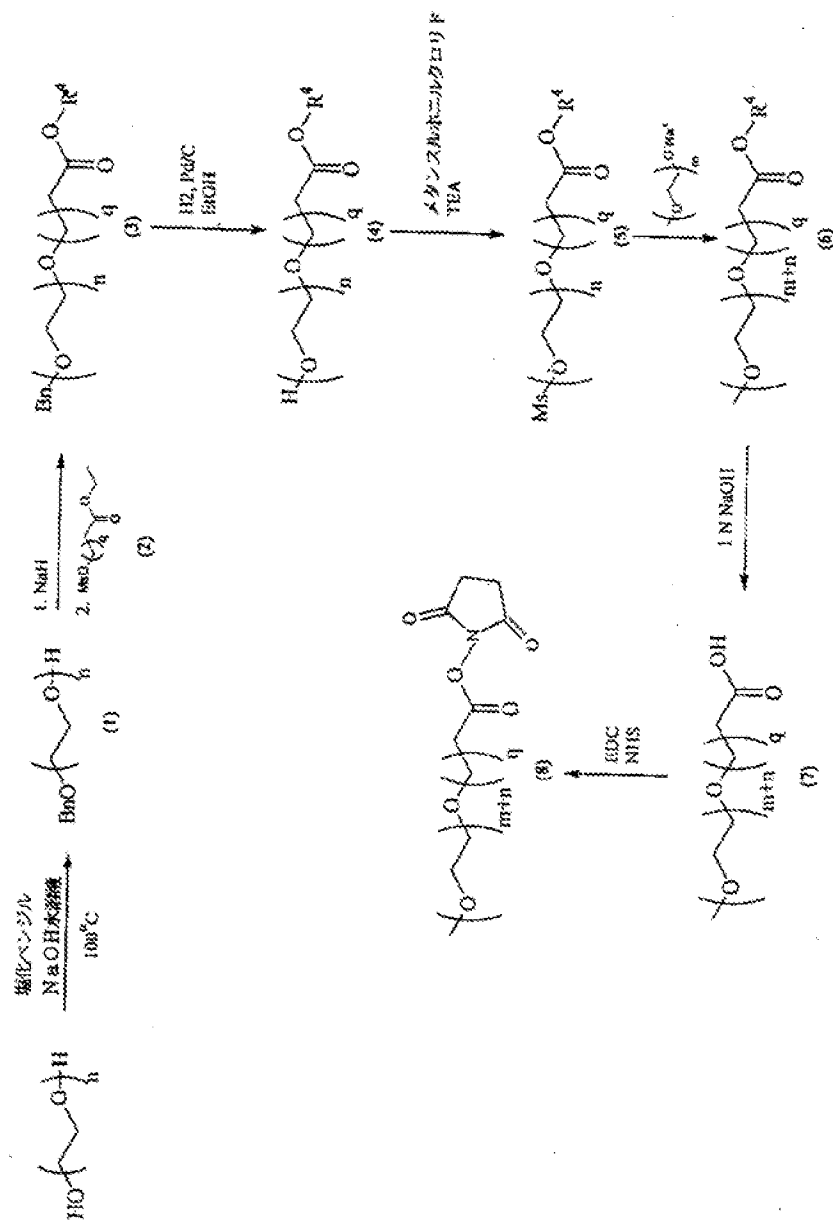
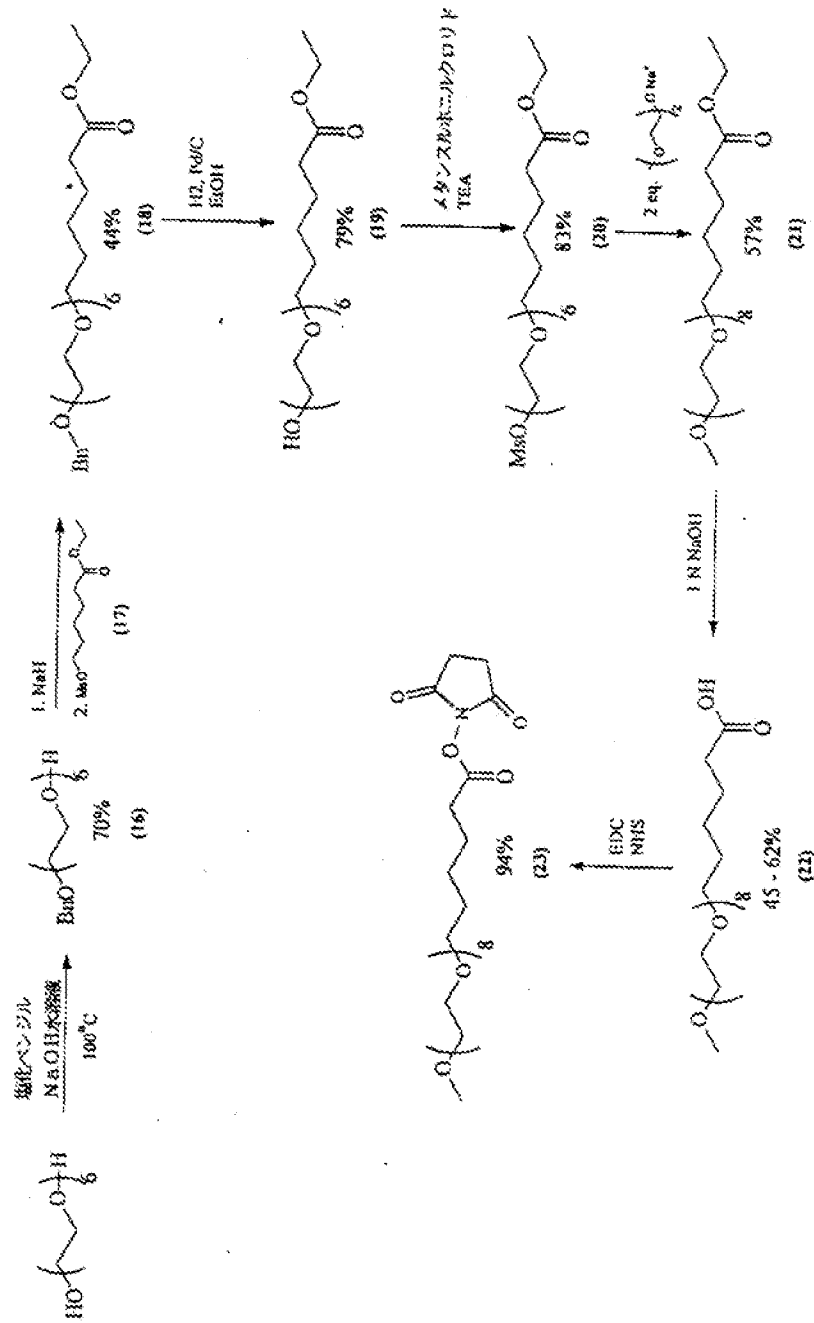


Figure 1

【29】



**Figure 3**

Figure 4